

MIKROBIELLE VERUNREINIGUNGEN
PFLANZLICHER ARZNEIZUBEREITUNGEN UND MÖGLICHE
MASSNAHMEN ZUR KEIMZAHLREDUZIERUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaften
des Fachbereiches Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

MASSOUD NIKBACHT

aus Isfahan / Iran

Marburg 1974

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am: 13.3.1974

Tag der mündlichen Prüfung: 24.4.1974

Berichterstatter : Professor Dr. P. H. List

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. W. Schiff

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für pharmazeutische Technologie und am Hygiene-Institut der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung der Herren Professoren List und Schiff angefertigt.

Herrn Prof. Dr. P. H. L i s t

danke ich für die Zuweisung dieses Themas, für die Arbeitsmöglichkeiten an seinem Institut, für die vielen Diskussionen sowie für die immer wohlwollende Unterstützung bei allen Problemen.

Herrn Prof. Dr. W. S c h i f f

bin ich für die praktische und theoretische Einführung in die Bakteriologie sowie für seine stete Hilfe bei allen mikrobiologischen Fragen dankbar.

Ferner gilt mein Dank den Firmen F i n z e l b e r g 's Nachfolger, Andernach, und Ludwig H e u m a n n & Co., Nürnberg, an deren Produktionsanlagen ich einen Teil der Untersuchungen durchführen konnte und die mir die Drogen für die Modellversuche zur Verfügung stellten..

Inhalt

	Seite
I. Einführung und Problemstellung	4
II. Untersuchungsobjekte und deren Herstellungsablauf	14
III. Keimzahlbestimmungen an Stichproben während der Produktion	20
IV. Keimzahlbestimmungen im Modellversuch	29
V. Qualitative Keimuntersuchungen	32
VI. Versuche zur Verminderung der endgültigen Keimzahlen	35
VII. Diskussion	52
VIII. Zusammenfassung	57
IX. Beschreibung der Versuche	58
X. Literaturverzeichnis	71

Allgemeiner Teil

I. Einführung und Problemstellung

Die wegen des Auftretens bakterieller Krankheitserreger in Arzneimitteln spektakulären Ereignisse in Schweden in den Jahren 1965 und 1966 veranlaßten die dortigen Gesundheitsbehörden zu systematischen Untersuchungen einer großen Zahl verschiedener Spezialitäten und Arzneimittel¹⁾. Diese Untersuchungen sind inzwischen in die Geschichte der Pharmazie eingegangen.

Seit dieser Zeit bemühen sich nationale und internationale Expertenkomitees um die Festlegung vertretbarer Keimzahlgrenzen für die verschiedenen Arzneiformen. Einigkeit herrscht bislang darüber, daß Injektabilia und Ophthalmica keimfrei zu sein haben. Auch ist man sich einig, daß Präparate zur Anwendung an Schleimhäuten (außer Augen) und an der verletzten Haut nicht mehr als 100 Keime/g enthalten dürfen und frei sein müssen von pathogenen Keimen.

Dagegen gehen die Meinungen über den maximalen Gehalt an apathogenen Keimen in den Oralia und allen übrigen Arzneiformen noch weit auseinander. Zur Zeit stehen sich in der Diskussion zwei Gruppen gegenüber; die strengere der beiden vertritt als oberste Grenze 10^2 Keime/g, die andere 10^4 Keime/g. Beide Gruppen führen gewichtige Gründe für die von ihnen geforderten Grenzen an.

Mikroorganismen in Arzneizubereitungen sind in dreierlei Hinsicht von Bedeutung:

1. bilden sie für den Patienten eine Infektionsgefahr,
2. bilden Mikroorganismen u.U. toxische oder anderweitig schädliche Stoffwechselprodukte, und
3. bauen sie Arzneistoffe ab, so daß im Laufe der Lagerung eine Wertminderung eintritt.

Verschärfend für die Punkte 1 und 2 wirkt die Tatsache, daß für einen geschwächten Patienten auch andere als die notorisch pathogenen Keime infektiös wirken können und daß weit

geringere Konzentrationen an Toxinen zur Schädigung ausreichen als beim Gesunden.

Daraus leitet die strengere Gruppe ihre Forderung von maximal 10^2 Keimen/g ab.

Dem entgegen steht der technische Aufwand zur Einhaltung dieser Grenzen. Deshalb vertritt die andere Gruppe einen Grenzwert von 10^4 Keimen/g und begründet dies im wesentlichen mit folgendem Hinweis.

In den unterentwickelten Randgebieten südamerikanischer und arabischer Großstädte leben - oder exakter vegetieren - Tausende von unterernährten Kindern, die nur geringe oder keine Abwehrkräfte besitzen. Sie erhalten über die UNICEF eine Mischung von Cerealien, Trockenmilch und preiswerten Produkten, als sog. UNICEF - weaning food. Die Mischung ist wenig schmackhaft, um der Gefahr zu entgehen, daß sie den Kindern von Erwachsenen weggenommen wird. Das trockene Pulver wird mit sterilisiertem Wasser zu einem Brei verrührt und muß so keimarm sein, daß die Kinder keinen Durchfall oder sonstige Krankheiten bekommen. Die hier maximal zulässige Keimzahl stellt ein sowohl medizinisch als auch wirtschaftlich vertretbares Maß dar für den Höchstkeimgehalt einer peroral zu verabreichenden Arznei. Sie liegt in der Größenordnung von 10^4 Keimen/g (MOSSEL und LIST)²⁾.

In allen bisher aufgestellten Forderungen werden für die Oralien und übrigen Arzneiformen "pathogene Keime" ausgeschlossen.

So wurde in der mit Wirkung vom 1.9.1970 in Kraft getretenen USP XVIII (Kapitel: Mikrobial limit tests) eine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl und zum Nachweis pathologisch oder hygienisch bedeutsamer Keimarten, nämlich Salmonella, Staphylococcus aureus und Pseudomonas aeruginosa sowie Escherichia coli aufgenommen³⁾.

Zur Ausarbeitung eines entsprechenden Kapitels für die Europäische Pharmakopöe wurden von PENSO 37 inzwischen Vor-

schläge unterbreitet. Während in USP XVIII eine Ausdehnung der Untersuchung auch auf andere möglicherweise vorkommende Keimarten als die genannten, allerdings ohne deren namentliche Benennung offengelassen ist, wird in verschiedenen Veröffentlichungen der letzten Jahre eine regelmäßige Einbeziehung weiterer Arten wie Schimmelpilze und Hefe, Enterokokken, *Clostridium perfringens* und *Clostridium botulinum* sowie *Bacillus cereus* für notwendig erachtet. Alle Autoren stimmen bezüglich der Notwendigkeit einer Untersuchung von Arzneimitteln auf bedenkliche Keimarten wie pathogene Staphylokokken und Pseudomonaden überein. Das Vorhandensein jeglicher mit Sicherheit pathogener Keime ist streng zu untersagen. Dagegen bestehen abweichende Auffassungen darüber, ob man, wie in USP XVIII beschrieben, gezielt nach Salmonellen als potent pathogene Keime und nach *Escherichia coli* als Indikator fäkaler Kontamination fahnden soll, oder ob zur Vereinfachung lediglich eine orientierende Untersuchung auf Anwesenheit von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae angezeigt sei. In Heft 8 der "Pharm. Ind." von 1972 ist eine Reihe von Publikationen abgedruckt, die sich mit der Frage einer maximal zulässigen mikrobiellen Kontaminierung gewisser Wirk- und Hilfsstoffe befassen.

In dem dortigen Aufsatz von WALLHÄUSER⁴⁾ werden die 1972 vorgeschlagenen Anforderungen der F.I.P. und der E.P. dem Vorschlag für das DAB 8 gegenüberstellt. In der Tabelle 1 sei diese Gegenüberstellung wiedergegeben. Die darin enthaltenen deutschen Anforderungen haben dem pharmazeutischen Ausschuß des Bundesverbandes der Pharmazeutischen Industrie zur Begutachtung vorgelegen und wurden von ihm gebilligt und zur Veröffentlichung freigegeben. Diese Grenzwerte sind in Abhängigkeit von den Reinheitsforderungen für die hergestellten Arzneimittel zu sehen.

Einheitliche starre Grenzwerte sollten daher bei Wirk- und Hilfsstoffen nicht aufgestellt, sondern die Präzisierung der mikrobiologischen Reinheit den Erfordernissen angepaßt werden. Der verarbeitende Betrieb hat darüber zu entscheiden,

ob eine Keimreduzierung oder Keimabtötung während der Herstellung möglich ist, oder ob durch Vermehrung vorhandener Keime u.U. ein Risiko für das Endprodukt und damit sogar für den Patienten entsteht. Bei einem Gehalt an Salmonellen, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* müssen Wirk- und Hilfsstoffe abgelehnt werden, da diese Keime auf eine hygienisch nicht einwandfreie Herstellung oder Gewinnung schließen lassen. Das gleiche gilt für die Anwesenheit einer Reihe weiterer Keimarten, wie auch für extrem hohe Kontaminierung mit banalen Boden- oder Luftkeimen. Diese bakteriologischen Parameter stellen ein Warnsignal für eine Überprüfung der Produktion dar, vor allem dann, wenn es sich um Naturstoffe handelt.

Die oft bedenkenlos geäußerte pauschale Forderung "frei von pathogenen Keimen" geht über die Aussagefähigkeit eines in vitro Tests hinaus, denn selbst in Tierversuchen ist eine Entscheidung, ob pathogen oder nicht, nur beim Vorhandensein eines geeigneten Versuchsmodells möglich. Zudem zeigt es sich immer wieder, daß es nicht möglich ist, eine feste Grenze zwischen pathogenen und apathogenen Keimen zu ziehen, können doch bestimmte Keime, die zwar beim Gesunden als harmlos anzusehen sind, bei Kranken oder Kleinkindern zu Infektionen oder Intoxikationen führen.

Die gleichen Schwierigkeiten einer Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen Mikroorganismen bestehen bekanntlich seit langem bei der hygienischen Untersuchung von Trinkwasser und Lebensmitteln.

Hier beschränkt man sich im Zweifelsfall ebenfalls auf den Nachweis bestimmter "Fäkal- und Risikokeime" sowie auf einen noch zumutbaren höheren Gehalt an "banalen" Mikroorganismen und beurteilt danach die Qualität der Probe in hygienischer Sicht.

Nach BPI (Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie) sollen für die Wirk- und Hilfsstoffe nachstehende mikrobiologische Anforderungen gelten:

1. frei von Salmonellen, Staphylokokkus aureus; Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli,
2. anzustrebende Gesamtkeimzahl (aerobe Bakterien, Streptomycceten, Schimmelpilze und Hefen) max. $10^3/g$. (Es ist bereits erwähnt worden, daß MOSSEL und LIST für einen maximalen Keimgehalt von $10^4/g$ plädieren.)²⁾
3. Wenn keine keimreduzierenden Maßnahmen möglich sind, können in zu begründenden Fällen bis zur Feststellung allgemein verbindlicher Richtlinien Ausnahmen zugestanden werden, wenn dadurch das Arzneimittel gemäß §§ 6, 8 AMG nicht beeinträchtigt wird.

Vorstehende Richtlinien haben keine internationale Gültigkeit. Hinsichtlich der Gesamtkeimzahl ist man mit Ausnahme der für die Behandlung der verletzten Haut vorgesehenen Präparate von ursprünglich schwedischen Forderungen (100 Keime/g bzw. ml) längst abgerückt. Entgegen mißverständlichen Meldungen in "The Pink Sheet" wird in dem "F-D-C-Reports" die Meinung des FDA-Direktors Ted BYERS wiedergegeben, wonach "in any event, it was not designed as an indication that FDA is considering a total-count microbial standard".

F-D-C-Reports überschreibt diese Stellungnahme BYERS mit "No 100 count microbiological standard for U.S. Drugs & Cosmetics".⁴⁾

Die Ansicht einiger europäischer Institutionen zu diesen Fragen ist aus Tabelle 1 ersichtlich. Auch hier ist ganz eindeutig zu erkennen, daß man flexibel bleiben möchte. Für die Kategorie II bzw. III des FIP-Vorschlages (Dermatika für die verletzte Haut) werden "Richtlinien" von 100 Keimen/g bzw. ml genannt, während man für die nachfolgende Kategorie (alle übrigen Präparate) 1000 Keime/g bzw. ml zuzulassen vorschlägt. Dabei bezieht man jedoch in den FIP- und den DAB-Vorschlägen die Schwankungsbreite der Keimzahlbestimmungen (1 Zehnerpotenz) ein und ist bereit, für bestimmte Produkte, besonders in Gegenwart von natürlichen Rohstoffen, deren Keimzahl mit

herkömmlichen Verfahren reduziert werden kann, bis zu 10^4 Keime/g bzw. ml zu akzeptieren, wenn dadurch keine Gefahr für den Verbraucher entsteht.

Tab.1: Die zur Diskussion stehenden Anforderungen für Arzneimittel, die nicht steril sein müssen.

Produkte	Fédération Internationale Pharmaceutique, Vorsh. 1972		Europäische Pharmakopöe, Vorschlag 1972*		Deutsches Arzneibuch Vorschlag 1971	
	Kategorien und Anforderungen					
	I	steril	I	steril	I	steril
Injektabilia	II	frei von vermehrungsfähigen Keimen in 1 g				
Ophthalmika						
Präparate zur lokalen Anwendung für die verletzte Haut (Dermatika), Nasen- u Ohrenpräparate, Vaginaovula, Inhalationspräparate u. Schleime f. die gynäkologische Praxis	III	≤100 Keime/g oder ml, Enterobakterien, Ps. aeruginosa, Staph. aureus nicht nachweisbar	II	≤100 Bakt /g bzw ml, ≤10 Pilze od. Hefen /g od ml frei von pathogenen Mikroorganismen	II	≤100 Keim/g bzw. ml E.coli, Ps.aeruginosa, Salmonellen, Staph. aureus nicht nachweisbar
Oralia und alle übrigen Präparate	IV	≤10 ³ (10 ⁴) Bakt./g bzw.ml, ≤10 ² Pilze od. Hefen /g od.ml, frei von Enterobakterien Ps. aeruginosa u Staph. aureus in 1g bzw ml	III	≤10 ³ /g od. ml, bis 50 Pilze od. Hefen frei von pathog. Keimen		≤10 ³ (10 ⁴) Bakt./g bzw. ml, frei von E. coli, Ps. aeruginosa, Salmonellen u Staph. aureus in 1g bzw. ml
			IV	< 5 · 10 ³ Bakt./g od ml 10 ² Pilze od Hefen, frei von Pathogenen bei Produkten auf Gelatinebasis.	III	
x) G. Penso (Italien)						

x) G. Penso (Italien)

Wie wichtig und zugleich problematisch eine Reduzierung des Keimgehaltes von Grund- und Hilfsstoffen ist, geht aus verschiedenen Publikationen hervor; so berichteten SPEISER und WANANDI 1970 ausführlich über die mikrobielle Verunreinigung von Arzneiformen und Hilfsstoffen verschiedener nicht steriler Arzneiformen des Handels und zum Teil eigener Herstellung, wobei auch Grund- und Hilfsstoffe mit einbezogen waren⁵⁾.

Auch haben sich BÜHLMANN und Mitarbeiter und zuletzt D. KRÜGER mit den Keimgehalten pharmazeutischer Hilfsstoffe befaßt⁶⁾.

Nils DIDING, Lena WERGEMANN und G. SAMUELSSON brachten in einer Arbeit⁷⁾ über Äthylenoxidbegasung von rohen Drogen eine Aufstellung der von ihnen ermittelten Keimzahlen, die in nachstehender Tabelle 2 wiedergegeben sind. Aus diesen Arbeiten geht hervor, daß Drogen bezüglich des mikrobiellen Befalls ein äußerst kritisches Rohprodukt darstellen, wenn darunter auch einige Arten mit erstaunlich niedrigen Werten zu sein scheinen (vgl. Tabelle 2, Podophyllum und Cortex quillaiae u.a.).*)

In der Literatur über den Keimgehalt pflanzlicher Arzneizubereitungen wie wäßrige Drogenauszüge, Tinkturen, Fluidextrakte und Trockenextrakte liegen bisher kaum Mitteilungen vor.

*) Auf dieses Phänomen wird im Kapitel VII noch eingegangen werden.

Tabelle 2: Keimgehalt von im Handel befindlichen Drogen
nach: DIDING, WERGEMANN und SAMUELSSON⁷⁾

Drogen	Gesamtkeimzahl Pro g Droge		Anzahl Coliform. Pro g Droge
	20 ° C	35 ° C	35 ° C
Agar	1.400	1.000	150
Amylum solani	1.500	1.400	0,4
Cortex cinchonae	9.300	19.600	2
Cortex frangulae	10.200	12.300	1,5
Cortex quillaiae	675	1.200	1,5
Cortex rhamni	1.000	1.950	0,2
Folia belladonnae	825.000	640.000	150
Folia digitalis	2.480.000	3.060.000	150
Folia sennae	21.000	22.000	150
Fructus sennae	99.000	160.000	150
Gelatina	10	160	0,2
Gummi arabicum	68.000	230.000	150
Herba thymi	166.000	220.000	150
Opium	2.900	9.000	0
Podophyllum	0	0	0
Radix gentianae	1.980	3.480	0
Radix glycyrrhizae	86.000	72.000	150
Radix senegae	1.032.000	900.000	150
Rhizoma valerianae	177.000	260.000	150
Semen lini	456.000	350.000	3

In den meisten Fällen sind Extrakte nicht als eigentliche Arzneiformen zu betrachten. Sie stellen vielmehr Halbzeug dar, das in weiteren Arbeitsgängen zu Arzneiformen, wie Tabletten, Dragees u.a., verarbeitet wird. Nur die sogenannten "Tassenfertigen Wirkstoffextrakte" sind Arzneiformen an sich. Sie werden vom Endverbraucher in heißem Wasser gelöst eingenommen. Da sie klar wasserlöslich sein müssen, kommt für die Herstellung nur Wasser als Menstruum in Frage. Daraus folgt, daß bei der z.T. hohen Ausgangskeimzahl der Drogen die Gefahr der mikrobiellen Verunreinigung des Endproduktes besonders groß ist, um so mehr deshalb, weil alle modernen Verfahren zur Herstellung von Extrakten darauf abzielen, die Inhaltsstoffe thermisch möglichst wenig zu beanspruch. Eine Schonung der Inhaltsstoffe bedeutet aber u.U. auch eine Schonung der Keime.

Für die vorliegende Arbeit sollte zunächst einmal an handelsüblichen "tassenfertigen Wirkstoffextrakten" der Keimgehalt von der Ausgangsdroge bis zum Endprodukt zählend verfolgt werden, wobei jeder Produktionsschritt zu erfassen war. Weiterhin sollten die auf den Drogen gefundenen Bakterien identifiziert werden. Schließlich waren Verfahren zu suchen, mit deren Hilfe eine Reduzierung der Keime auf eine vertretbare Zahl wirtschaftlich erreicht werden kann.

II. Untersuchungsobjekte und deren Herstellungsablauf

Als Untersuchungsobjekte dienten zwei handelsübliche Extrakte, deren einer als Bronchial-Tee und deren anderer als Blasen- und Nieren-Tee Verwendung finden. Bei den Herstellern - und auch in folgendem Text - tragen sie die Bezeichnungen H 700 und H 740.

Die gewählten Extrakte waren aus folgenden Gründen für die Fragestellung besonders geeignet:

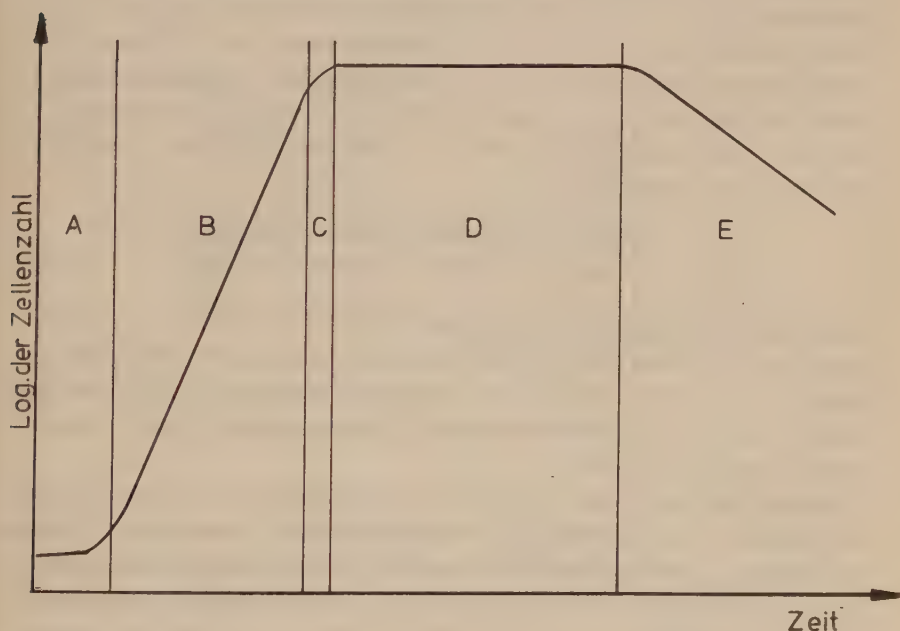
1. Das Ausgangsmaterial ist in beiden Fällen ein Gemisch aus Drogen verschiedener morphologischer Struktur und Provenienz.
2. Auf Grund der Drogenarten (sowohl verwendeter Pflanzenteil, z.B. Wurzel, als auch Inhaltsstoffe, z.B. Schleime) war mit hohen Keimzahlen zu rechnen.
3. Da Wasser als Menstruum verwendet wird und nicht verd. Alkohol, war bei der Extraktion mit einer Keimzahlvermehrung zu rechnen.

Die genannten Voraussetzungen (Inhaltsstoffe und Wasser als Menstruum) plus günstige Temperatur ($20 - 25^{\circ} \text{C}$) bilden optimale Wachstumsbedingungen für die auf den Drogen befindlichen Dauerformen der Mikroorganismen (Sporen). Mikroorganismen wachsen in einer statischen Kultur grundsätzlich nach einem bestimmten Schema.

Werden Bakterien in eine Nährlösung eingepft - die Kontamination einer wäßrigen Miscella mit Keimen während der Herstellung entspricht dem -, so wachsen sie im allgemeinen so lange, bis ein Nährfaktor ins Minimum gerät und das Wachstum begrenzt. Werden während dieses Vorganges keine Nährstoffe zu- und Stoffwechselprodukte abgeführt, so bezeichnet man das Wachstum in diesem vorgegebenen Lebensraum als sta-

tische Kultur. Da im Falle von Mikroorganismen vereinfachend Wachstum gleich Vermehrung (Teilung) bedeutet, läßt sich die je ml Substrat vorhandene Keimzahl über der Versuchszeit graphisch auftragen. Man erhält so typische Wachstumskurven mit charakteristischen Abschnitten, den Wachstumsphasen, wie sie in der nachfolgenden Abbildung 1 dargestellt sind.

Abbildung 1



Wachstumskurve

- A = Anlaufphase (lag-Phase)
- B = exponentielle oder logarithmische Phase
- C = Phase verzögerten Wachstums
- D = stationäre Phase
- E = Absterbephase

Bei der Extraktion von Drogen mit Wasser werden die auf den Pflanzenteilen lebenden Keime teilweise abgespült und gelangen in die Miscella. Bleibt diese lange genug unver-

arbeitet stehen, so wird nach Ablauf der lag-Phase eine lebhafte Keimvermehrung beginnen.

Beim Durchlaufen von Verdampfern, die eine Materialtemperatur von max. 80° bedingen, oder bei anderen Prozessen mit entsprechend höherer Temperatur werden Mikroorganismen abgetötet. Dies betrifft i.a. nur die vegetativen Formen, während thermophile Arten und vor allem Dauerformen überleben. Lagerzeiten (Stunden bis Tage) von Zwischenprodukten können zum Auskeimen der Sporen und zur Keimvermehrung führen, wenn die Wasseraktivität (= aW) des Substrates genügend hoch ist. Sie stellt ein Maß für das den Mikroorganismen zur Verfügung stehende Wasser dar und errechnet sich aus dem Wasserdampfdruck über dem Substrat (in unserem Fall der Arzneizubereitung) und dem Dampfdruck reinen Wassers bei der gleichen Temperatur nach der Formel:

$$aW = \frac{\text{Wasserdampfdruck über Substrat bei } t^{\circ}}{\text{Dampfdruck reinen Wassers bei } t^{\circ}}$$

Eine annähernd endgültige Keimzahl wird erst erreicht sein, wenn das trockene Endprodukt vorliegt (niedriger aW-Wert). Dabei ist zu berücksichtigen, daß mit Zuschlagstoffen und Lösungsmitteln (i.a. Wasser) evtl. Keime in noch zu erörternder Zahl eingebracht werden.

Damit dürften die in der vorliegenden Arbeit wiedergegebenen Ergebnisse die Situation bei besonders schwierigen Fällen darstellen. Die Zusammensetzung der Ausgangsdrogenmischung für beide Extrakte bzw. eine kurze Zusammenfassung des Herstellungsvorgangs ist in den Rezepturen auf Seite 17f. angegeben.

Während bei H 740 das Gesamtdrogengemisch mit heißem Wasser durch Perkolation extrahiert wird, müssen die Drogen des Gemisches H 700 unterschiedlich behandelt werden. Auch die weitere Aufarbeitung bis zum Trockenextrakt ist in beiden Fällen verschieden.

Die Herstellung der beiden "Tassenfertigen Wirkstoffextrakte" erfolgt in zwei verschiedenen Produktionsstätten. In der

ersten wird jeweils aus dem Drogengemisch ein Auszug bereitet, der dann nach Durchlaufen einiger Prozesse und Konzentrieren bis zum Spissumextrakt an die zweite Produktionsstätte nach Abruf übersandt wird. Dabei treten Lagerzeiten bis zu mehreren Monaten auf.

In der zweiten Produktionsstätte wird der jeweilige Spissumextrakt in heißem Wasser gelöst und mit verschiedenen Zuschlagstoffen versetzt.

Die ersten Teilherstellungsgänge für beide Extrakte sind in der Abb. 2 schematisch dargestellt.

Rezeptur für Gemisch H 700:

Ansatz 1: Folia Farfarae 250 kg

Lichen Islandicus 200 kg

Extraktionsmittel: kaltes Wasser

Ansatz 2: Radix Primulae 40 kg

Extraktionsmittel: heißes Wasser (ca. 70 ° C)

+ Diäthylaminoäthanol = 0,4 kg

Ansatz 3: Radix Althaeae

Extraktionsmittel: kaltes Wasser

Die Spissumextrakte aus den Ansätzen 1 und 2 werden in Wasser gelöst, filtriert^{*)} und erneut zu Spissumextrakten eingedampft. Anschließend werden die Spissumextrakte 1, 2 und 3 miteinander vermischt.

*) Statt einer Filtration klärt man die Lösung heute mit Separatoren.

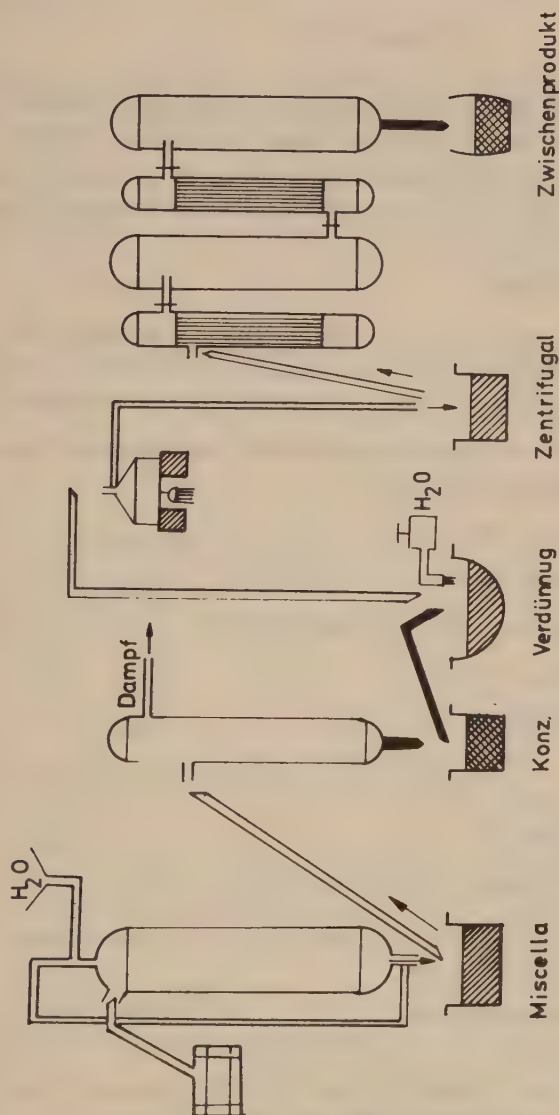
Rezeptur für Gemisch H 740:

<u>Drogenansatz:</u>	Herba Equiseti	300 kg
	Herba Solidaginis virgaureae	200 kg
	Folia Orthosiphonis	200 kg
	Folia Betulae	<u>300 kg</u>
		1000 kg

Extraktionsmittel: heißes Wasser (ca. 70 ° C)

Der Spissumextrakt wird in Wasser aufgelöst, filtriert^{*)} und erneut zum Spissumextrakt eingedampft.

^{*)} Statt einer Filtration klärt man die Lösung heute mit Separatoren.



PRODUKTIONSSTÄTTE I

Schematische Darstellung des Produktionsablaufs in Herstellungsstätte I

III. Keimzahlbestimmungen an Stichproben während der Produktion (Herstellungsstätte 1)

Extrakt H 740

An der Produktionsstätte selbst wurden Proben zur Keimzahlbestimmung sowohl von den einzelnen Drogen als auch von den Zwischenprodukten während des Produktionsablaufes gezogen. Als sinnvolle Stellen der Probenahme für H 740 erschienen folgende:

In Herstellungsstätte 1:

0. Ausgangsdrogen: von allen in der Rezeptur (s. Seite 18) aufgeführten Drogen wurden die Keimzahlen ermittelt (die Berechnung bezieht sich auf 1,0 g lufttrockene Droge).
1. Erster Ablauf der Miscella nach Füllen des Perkulators mit Wasser zur Zwischenmazeration.
2. Miscella nach der Perkolation
3. Eingedickte Miscella nach Verdampfer I
4. Nach Verdünnung der eingedickten Miscella
5. Nach Separation
6. Nach Verdampfer II
7. Spissumextrakt 3 Tage nach Herstellung

In Herstellungsstätte 2:

1. Spissumextrakt 1 Monat nach Herstellung
2. Sprühfertiger Ansatz aus Spissumextrakt und Zuschlagstoffen⁺)
3. Verkaufsfertiges Endprodukt

⁺) Die Keimzahlen der Zuschlagsstoffe wurden separat ermittelt und sind in Tabelle 7 (Seite 27) angegeben.

Die in den gezogenen Proben ermittelten Keimzahlen N sind in Tabelle 3 aufgeführt und in Abb. 3 graphisch dargestellt. Sie beziehen sich auf die Trockensubstanz und sind in Anzahl / g angegeben.

Tabelle 3: Keimzahlen von Proben der verschiedenen Herstellungsschritte von Extrakt H 740 (pro g T.S.)⁺

Ergebnis:

Nr. Schritte	Datum	Zeit	Keimzahl N/g	log N
0) Ansatzdrogen	2.9.71		9×10^4	4,95424
1) Füllen heißes H ₂ O (70°C) Auszug	2.9.71	17.00	4×10^5	5,60206
2) Tag später	3.9.71	6.00	1×10^4	5,00000
3) nach Verdampfer I	3.9.71	8.00	$1,2 \times 10^5$	5,07918
4) nach Auflösen	3.9.71	9.45	$2,5 \times 10^5$	5,39794
5) nach Separieren	3.9.71	10.30	$1,6 \times 10^5$	5,20412
6) nach Verdampfer II (fertiger Extrakt)	3.9.71	17.00	$1,1 \times 10^4$	4,04021
7) 3 Tage später	6.9.71	8.00	$1,2 \times 10^4$	4,07918
1) nach 1 Monat	11.10.71	15.00	6×10^4	4,77815
2) Zwischenprobe d. fertigen Extr.	12.10.71	8.00	$6,4 \times 10^3$	3,80618
3) verkaufsfert. Prod. getrocknet	12.10.71	16.00	$4,7 \times 10^3$	3,67210

T.S. = Trockensubstanz

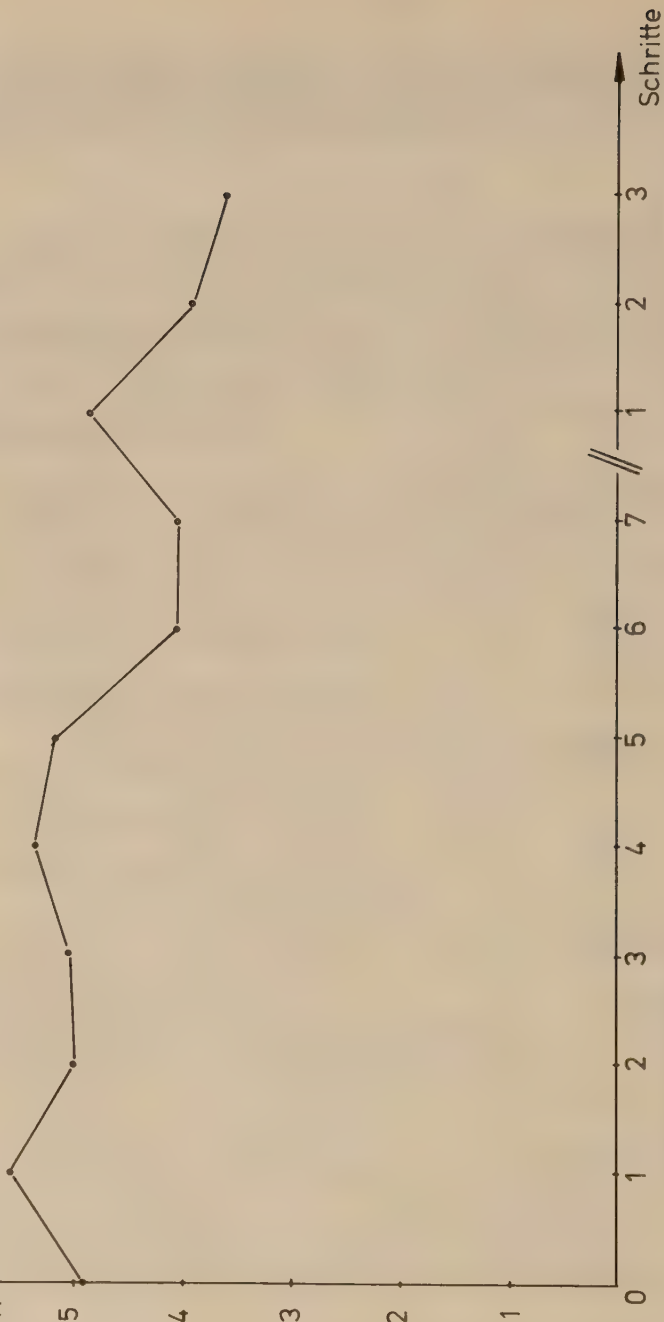
+) siehe die dazugehörige Kurve

Abb 3

Extr. H74.0

N = Keimzahl / g

log N



Produktionsstätte 1

Produktionsstätte 2

Keimzahlen von Proben der verschiedenen Herstellungsschritte von H 74.0

Der Bezug auf Trockensubstanz ist notwendig, weil bei einer bloßen Angabe von Keimen/g des jeweils zu untersuchenden Zwischenproduktes keine vergleichbaren Ergebnisse erhalten würden. Dies sei an einem Beispiel erläutert:

Würden 100 kg Spissumextrakt mit 50 % TS (Trockensubstanz) 1000 Keime/g enthalten und würden daraus durch Zusatz von keimarmem Wasser 500 kg Lösung hergestellt, so läge ein Zwischenprodukt mit 200 Keimen/g vor. Es träte somit scheinbar eine Keimverminderung ein. Bezieht man jedoch auf Trockensubstanz, so hat der Spissumextrakt 2000 Keime/g und die Verdünnung ebensoviel.

Keimzahlbestimmungen an Stichproben während der Produktion (Herstellungsstätte 1)

Extrakt H 700

Bei H 700 ist der Herstellungsgang insofern verschieden, als die Ausgangsdrogen in unterschiedlicher Weise extrahiert werden. Es ergeben sich deshalb drei voneinander getrennt zu untersuchende Ansätze (s. dazu Rezeptur S. 17).

Von den Ansätzen 1 und 3 wurden bis zur Vereinigung die Proben an den gleichen Stellen des Produktionsganges wie bei H 740 gezogen.

Von Ansatz 2 erfolgte die Probenahme so, daß nach Verdampfer I (Probe Nr.3) die Untersuchung beendet war (die Miscella von Radix Althaeae passiert den Verdampfer nur einmal).

Nach Vereinigung der Teilauszüge wurde in Herstellungsstätte 1 noch einmal nach 3 Tagen eine Probe entnommen und dann in Herstellungsstätte 2 wie bei Extrakt H 740 verfahren.

Die erhaltenen Werte sind in Tabellen 4 - 6 aufgeführt und in Abb. 4 graphisch dargestellt.

Wie die graphischen Darstellungen der im Produktionsverlauf ermittelten Keimzahlen zeigen, tritt die erwartete Schwankung auf. Sie ist aber geringer als ursprünglich vermutet, besonders wenn man berücksichtigt, daß bei derartigen bakteriologi-

schen Bestimmungen Schwankungen innerhalb einer Zehnerpotenz nicht überbewertet werden können. Das bedeutet aber, daß die bislang übliche Betriebshygiene keinen verschlechternden Einfluß auf das Endprodukt hatte.

Tabelle 4: Keimzahlen von Proben der verschiedenen Herstellungsschritte von Extrakt H 700 (pro g T.S.)

Erster Ansatz:

Herstellung in Produktionsstätte 1

Ansatzdroge bzw. Ansatzmenge:

Folia Farfarae 250 kg

Lichen Islandicus 200 kg

Extraktionsmittel: kaltes Wasser

Ergebnis:

Nr. Schritte	Datum	Zeit	Keimzahl N/g	log N
0) Ansatzdroge	31.8.71	-	$1,5 \times 10^6$	6.17609
1) erster Ablauf	"	17.00	$1,1 \times 10^9$	9.04021
2) Miscella	1.9.71	8.00	$8,8 \times 10^8$	8.94448
3) Miscella (eingedickt) (Verdampfer I)	1.9.71	12.00	$1,5 \times 10^6$	6.17609
4) Verdünnung	1.9.71	15.00	$2,0 \times 10^6$	6.30103
5) Filtration	2.9.71	6.00	$1,5 \times 10^6$	6.17609
6) Filtrat (eingedickt) (Verdampfer II)	2.9.71	10.00	$5,0 \times 10^6$	6.59897

Tabelle 5: Keimzahlen von Proben der verschiedenen Herstellungsschritte von Extrakt H 700 (pro g T.S.)

Zweiter Ansatz:

Herstellung in Produktionsstätte 1

Ansatzdroge bzw. Ansatzmenge:

Radix Primulae 40 kg

Extraktionsmittel: heißes Wasser (ca. 70 ° C)

+ 0,4 kg Diäthylaminoäthanol

Ergebnis:

Nr. Schritte	Datum	Zeit	Keimzahl N/g	log N
0) Ansatzdroge	6.9.71	-	$36, \times 10^5$	5.55630
1) Erster Ablauf	6.9.71	15.00	$2,0 \times 10^6$	6.30103
2) Miscella	7.9.71	9.00	$1,7 \times 10^8$	8.23045
3) Miscella (eingedickt) (Verdampfer I)	7.9.71	11.00	$2,0 \times 10^6$	6.30103
4) Verdünnung	-	-	-	-
5) Filtration	-	-	-	-
6) Filtrat (eingedickt) (Verdampfer II)	7.9.71	15.00	$2,0 \times 10^4$	4.30103

Tabelle 6: Keimzahlen von Proben der verschiedenen Herstellungsschritte von Extrakt H 700 (pro g T.S.)

Dritter Ansatz:

Herstellung in Produktionsstätte 1

Ansatzdroge bzw. Ansatzmenge:

Radix Althaeae 200 kg

Extraktionsmittel: kaltes Wasser

Ergebnis:

Nr. Schritte	Datum	Zeit	Keimzahl N/g	log N
0) Ansatzdroge	6.9.71	-	$2,7 \times 10^6$	6,43136
1) erster Ablauf	6.9.71	15.00	$1,57 \times 10^6$	6,19677
2) Miscella	7.9.71	8.00	$5,3 \times 10^5$	5,72437
3) Miscella (eingedickt) (Verdampfer)	7.9.71	10.00	$2,4 \times 10^5$	5,38021

Diese drei Teilextrakte wurden nach dem Konzentrieren gemischt und hiervon unmittelbar die Keimzahl bestimmt. Sie betrug $4,0 \times 10^6$ (log N = 6,60206) Keime/g T.S.

Vor der weiteren Verarbeitung in Herstellungsstätte 2 lag eine Lagerzeit von 1 Monat.

In der Herstellungsstätte 2 wurden vor der Sprühtrocknung dem Zwischenprodukt H 700 nach Auflösen in Wasser Zuschlagstoffe zugesetzt, deren Keimgehalt in folgender Tabelle wiedergegeben ist. Das gleiche gilt sinngemäß für Extrakt H 740.

Tabelle 7: Keimzahlen der Zuschlagstoffe für Extraktproben
H 700 und H 740 der Produktionsstätte 2

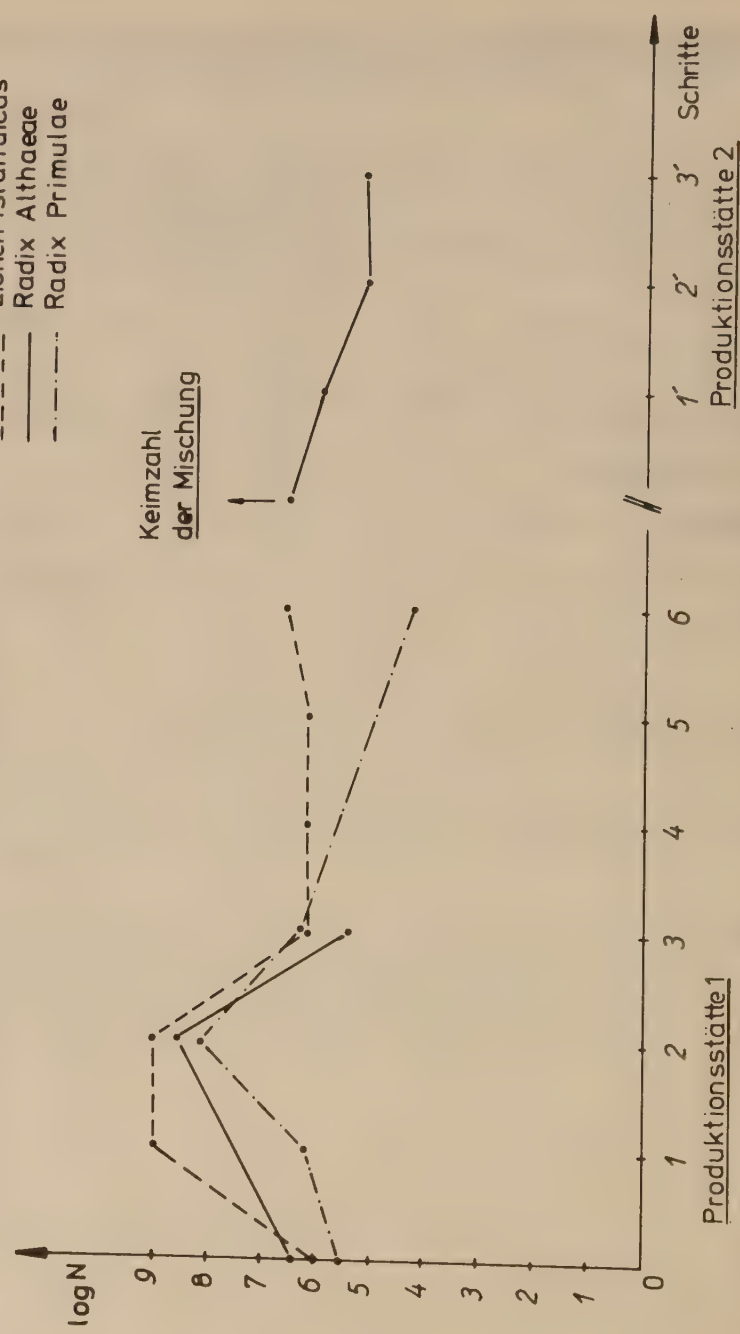
Zuschlagstoffe	H 700	H 740
	Keimzahl /	g T.S.
Stärkesirup	$5,5 \times 10^3$	.
Succus + H ₂ O Coulor	$5,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
Wasser	<10	<10
Milchzucker	<10	<10
Malzbiercoulor	<10	.
Dextrin	<10	<10

Abb. 4

Extr H 700

N = Keimzahl / g

- Lichen Islandicus
- Radix Althaeae
- - - Radix Primulae



Keimzahlen von Proben der verschiedenen Herstellungsschritte von H 700

IV. Keimzahlbestimmungen im Modellversuch Extrakt H 700

Die Berechnung der Keimzahlen der Proben aus dem Produktionsprozeß bezog sich jeweils auf 1,0 g Trockensubstanz der jeweiligen Probe. Bei den zu verarbeitenden großen Mengen an Drogen und Zwischenprodukten waren Ungenauigkeiten im Verdünnen, im Eindickungsgrad u.a. in einem Maße zu befürchten, daß diese die Tendenz des Kurvenverlaufs hätten beeinflussen können. Zur Überprüfung der Richtigkeit der Ergebnisse wurde deshalb ein Satz von Extrakt H 700 mit einem Zwanzigstel der industriellen Ausgangsmenge im Laboratorium so verarbeitet, daß alle Schritte möglichst den Großbetriebsbedingungen entsprachen.

Die Stellen der Probenahme (entsprechend Produktionsstätte 1) und die ermittelten Keimzahlen sind in Tab. 8 aufgeführt und in Abb. 5 graphisch dargestellt. Dabei wurden die Keimzahlen des gesamten Ansatzes berechnet, so daß nicht auf Trockensubstanz bezogen werden mußte.

Unter Berücksichtigung der in bakteriologischen Bestimmungen üblichen Fehlerbreite zeigten die Kurven den gleichen Verlauf wie die im Produktionsprozeß erhaltenen.

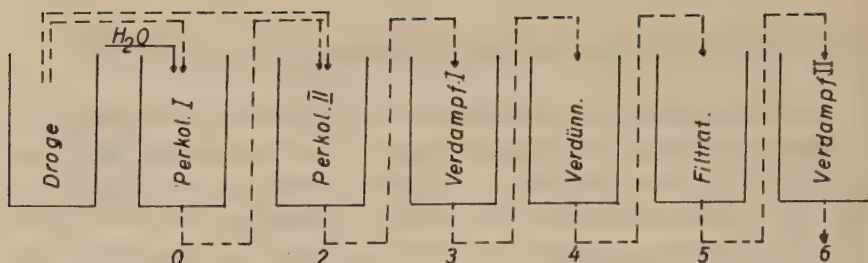


Tabelle 8: Keimzahlen von Proben der verschiedenen Herstellungsschritte von Extr. H 700 im Modellversuch

ART DER DROGE	MENGE DROGE	AUSZUG MISCELLA	NACH VERD. I	NACH VERDÜN.	NACH FILTRAT.	NACH VERD. II
Lich. + Farf.	2,25 kg	9,27 kg	2,95 kg	8,45 kg	8,40 kg	0,635 kg
Keimz. N absolut	$1,8 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{13}$	$3,9 \times 10^9$	$4,2 \times 10^{10}$	$6,7 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{10}$
log N	9,25527	13,17609	9,59106	10,62325	11,82607	10,07918
Rad. Primul.	0,2 kg	1,03 kg	0,155 kg	0,56 kg	0,52 kg	0,035 kg
Keimz. N absolut	$7,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$3,2 \times 10^9$	$4,7 \times 10^9$	-	$1,7 \times 10^6$
log N	7,85733	8,17609	9,50515	9,67210	-	6,23045
Rad. Althae.	1,00 kg	3,00 kg	0,49 kg			
Keimz. N absolut	$2,7 \times 10^9$	$1,7 \times 10^{14}$	$1,4 \times 10^9$			
log N	9,43136	14,23045	9,14613			

Gesamte Menge der gemischten Spissum-Extrakte = 1,160 kg
 Keimzahl N absolut = $2,3 \times 10^9$
 log N = 9,36173

Univ. Marburg

N = Keimzahl (absolut)

14

log N

12

10

8

6

4

2

Keimzahl
der Mischung
↑ •

----- Lichen Islandicus
----- Radix Althaeae
- . - . - . Radix Primulae

Schritte

6

5

4

3

2

1

0

Keimzahlen von Proben der verschiedenen Herstellungsschritte von H 700 im Modellversuch

V. Qualitative Keimuntersuchungen

Der von uns festgestellte, außerordentlich hohe Keimgehalt der erwähnten Extrakte wies nachdrücklich auf die Notwendigkeit hin, wirksame und rationelle Maßnahmen zur Keimreduzierung auszuprobieren.

Entsprechende Untersuchungen setzten die Vornahme qualitativer Keimbestimmungen voraus, da manche Arten und Formen von Mikroorganismen gegenüber antimikrobiellen Einflüssen unterschiedlich sensibel sein können. So erfordern sehr resistente Keime, und zwar vor allem Bakteriensporen, besonders intensive Maßnahmen, die aber keinesfalls die Wirksamkeit der Extrakte merklich beeinträchtigen dürfen. Darüber hinaus waren derartige Differenzierungsversuche auch deswegen angezeigt, weil der evtl. Nachweis pathogener Mikroorganismen insbesondere pathogener Darmkeime - unabhängig von der Keimzahl - auf schwerwiegende hygienische Mängel bei der Herstellung hinweisen würde.

Da für solche qualitativen Untersuchungen ein bakteriologisches Laboratorium notwendig war, habe ich diese Versuche im Hygiene-Institut der Universität Marburg unter Anleitung von Herrn Professor Schiff durchgeführt. Diese Versuche betrafen die beiden Spissumextrakte H 700 und H 740. Im wesentlichen sind von mir folgende Verfahren angewandt worden:

- A.) Zubereitung von Nährmedien zur Bakterienzüchtung und Gewinnung von Reinkulturen.
- B.) Herstellung und Färbung bakteriologischer Präparate, sowie quantitative und qualitative Keimbestimmungen.
- C.) Die Beurteilung der biochemischen Eigenschaften der isolierten Bakterienarten erfolgte gemäß Bergey's Manual of Determinative Bacteriology⁸⁾ sowie nach dem Handbuch von TOPLEY und WILSON "Principles of Bacteriology and Immunology"⁹⁾ und nach den Angaben von COWAN und STEEL.¹⁰⁾
- D.) Was speziell die Differenzierung aerober, sporenbildender Bakterien betraf, so richteten wir uns zusätzlich nach

der grundlegenden Arbeit von SMITH, GORDON und CLARK, "Aerobic Sporeforming Bacteria"¹¹⁾ sowie nach der einschlägigen Abhandlung von EMBERGER¹²⁾.

Für die Prüfung der biochemischen Leistungen der isolierten Bakterienstämme sind generell 13 verschiedene Differentialnährmedien verwendet worden. Die bei den Isolierungsversuchen bzw. nach Kulturpassagen "aufgesplitterten; optisch differenten Agarkolonien" sind mindestens zweimal mit dieser sog. "Bunten Reihe" überprüft worden. Zum Vergleich dienten Referenzstämmen von 14 verschiedenen Bazillenspezies, die wir der Tschechoslowakischen Sammlung von Mikroorganismen (CCM) der Universität Brunn verdanken.

Bei diesen Untersuchungen stellten wir folgendes fest: Der Spissumextrakt H 700 besaß einen Gehalt von 4×10^6 Keimen/g Trockensubstanz und der Spissumextrakt H 740 einen solchen von $6,6 \times 10^4$ Keimen. Den Kulturbedingungen entsprechend beziehen sich diese Keimzahlen ausschließlich auf aerob bzw. fakultativ anaerob sich vermehrende Bakterien. Bei den in beiden Extrakten nachgewiesenen Keimen handelte es sich durchweg um grampositive, gelegentlich auch gramlabile Stäbchen, die großenteils allerdings erst nach 1 bis 2 Wochen, Sporenbildung zeigten. Diese Bakterien waren somit, von den relativ wenigen Stämmen mit nichterbrachtem Sporennachweis abgesehen, der Gattung Bacillus zuzuordnen. Daß ein Sporennachweis nicht in allen Fällen glückt, ist eine bekannte bakteriologische Erfahrung, denn gewisse Bacillenspezies und -stämmen sind nur schwer zum Versporen zu bringen.

Was die Differenzierung der verschiedenen Bacillenspezies nun betrifft, so muß darauf hingewiesen werden, daß eine Erfassung weitgehend aller Bacillenarten einen sehr großen Aufwand an Zeit, Arbeit, Materialien und Einrichtungen voraussetzt. Wegen stark unterschiedlicher Wachstumseigenschaften und Stoffwechselbedingungen wäre nämlich eine Kombinierung verschiedener Kulturbedingungen notwendig gewesen, und zwar hauptsächlich hinsichtlich der Nährbodenzusammensetzung, der

Sauerstoffspannung, des pH-Wertes und der Bruttemperatur. "It is impossible to detect all bacilli successfully on media of one type by incubation under one kind of condition" (EM-BERGER). Ferner sei vermerkt, daß zahlreiche Bacillenspezies in verschiedenen, morphologisch stark differierenden Phänotypen und Varietäten (Subtypen) vorkommen und somit eine Spezies per se vortäuschen können. Schließlich stellen die Kolonien stark viskös wachsender Bacillen oft Mischungen verschiedener, nur schwer voneinander trennbarer und somit nicht ohne weiteres identifizierbarer Spezies dar.

Bei unseren Versuchen stellten wir in beiden Extrakten weitgehend die gleichen Bacillenarten fest. Mit Sicherheit bzw. großer Wahrscheinlichkeit waren die sieben folgenden, in der Reihenfolge der Häufigkeit ihres Vorkommens aufgeführten Bazillenspezies zu identifizieren:

- 1.) *Bacillus subtilis*
- 2.) *Bacillus pumilus*
- 3.) *Bacillus mycoides*
- 4.) *Bacillus licheniformis*
- 5.) *Bacillus megaterium*
- 6.) *Bacillus coagulans*
- 7.) *Bacillus circulans*

Diese Spezies machten mindestens 90 % der unter den angegebenen Kulturbedingungen kultivierten Bakterien aus. In den restlichen 10 % dürfte der Großteil der übrigen von insgesamt etwa 25 in der Literatur beschriebenen Bacillenspezies enthalten gewesen sein. Von anderen Bakterienarten fanden wir ganz vereinzelt nur vergrünende Streptokokken. Somit haben wir unter den aus den Extrakten gezüchteten Bakterien keine pathogenen Keime, insbesondere keine darmpathogenen Bakterien (z.B. Salmonellen oder enterotoxinbildende Staphylokokken) gefunden. Im Hinblick auf das vorgelegene Verfahren der Extraktgewinnung (Einwirkung von Temperaturen bis zu 80 ° C, wodurch vegetative Keime abgetötet werden), entsprach dies letztlich der Erwartung.

VI. Versuche zur Verminderung der endgültigen Keimzahlen

Mögliche Maßnahmen zur Keimzahlreduzierung

Für eine Reduzierung der Keimzahlen bieten sich sowohl chemische als auch physikalische Maßnahmen an, die an einer geeigneten Stelle des Produktionsganges durchgeführt werden müßten. Voraussetzung für die Art der Maßnahme einerseits sowie für den Zeitpunkt der Maßnahme andererseits ist, daß

1. eine drastische Verringerung der Keimzahl erreicht wird (Wirksamkeit der Maßnahme),
2. eine Rekontamination des Gutes oder eine wesentliche Vermehrung verbliebener Keime ausgeschlossen werden kann (günstiger Zeitpunkt für die Maßnahmen),
3. eine Veränderung des Gutes nicht eintritt (Unschädlichkeit der Maßnahme).

Obendrein sollte die Maßnahme wirtschaftlich tragbar sein.

Chemische Maßnahmen

Eine Reihe chemischer Verbindungen eignet sich zur Keimreduzierung, in entsprechend hoher Konzentration z.T. auch zur Sterilisation. In der Literatur beschrieben und in der Praxis angewendet sind die in Tabelle 9 aufgeführten Stoffe.¹³⁾ Hierbei sind die als Bakterizide wirksamen Verbindungen angesprochen, die unter geeigneten Bedingungen rückstandsfrei aus dem Sterilisationsgut entfernt werden können.

Tabelle 9

Nr.	Bezeichnung	Formel
1	Methylbromid	$\text{H}_3\text{C} - \text{Br}$
2	Äthylenoxid	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \diagdown \\ \\ \text{H}_2\text{C} \diagup \end{array} \text{O}$
3	Propiolacton	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{C} = \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{O} \end{array}$
4	Pyrokohlensäurediäthylester	$\begin{array}{ccccccc} \text{H}_5\text{C}_2 & & \text{O} & & \text{O} & & \text{C}_2\text{H}_5 \\ & & & & & & \\ \text{O} - \text{C} & - & \text{O} & - & \text{C} & - & \text{O} \end{array}$
5	Blausäure	$\text{H} - \text{C} \equiv \text{N}$

Für Drogen und pflanzliche Zubereitungen wurden häufig Äthylenoxid und Pyrokohlensäurediäthylester eingesetzt. Äthylenoxid wird heute allgemein im Drogenhandel und in der drogenverarbeitenden Industrie zur Vernichtung von Kleinlebewesen verwendet (Entwesung). Die dabei eingesetzten Konzentrationen von etwa 200 g/m^3 reichen zwar aus, Insekten in den verschiedensten Entwicklungsstadien zu vernichten, für die Keimreduzierung werden jedoch weit höhere Konzentrationen benötigt (SCHILCHER, 1970)¹⁴⁾.

Aus den bereits erwähnten Arbeiten von DIDING et al. geht hervor, daß selbst bei hohen Konzentrationen von Äthylenoxid und langen Einwirkungszeiten (1200 g T-Gas/m^3 ; 65 % rel. Feuchte; 15 Stunden; 28°C) nicht in allen Fällen eine befriedigende Keimzahlverminderung eintrat. So fanden sich bei gepulverter

Blattdroge von *Digitalis purpurea* (Sieb IV) mit einer Ausgangskeimzahl von $2,5 \times 10^6$ Keimen/g nach der Behandlung noch immer $1,5 \times 10^5$ Keime/g. Auch bei *Folia Belladonnae*, *Radix Liquiritiae*, *Rhizoma Valerianae* u.a. führte die Äthylenoxid-Begasung nicht zur Sterilisation.

Schwerwiegender jedoch als diese nicht in allen Fällen ausreichende Keimverminderung wiegt die Tatsache, daß unter den genannten Bedingungen Drogeninhaltsstoffe durch Reaktion mit Äthylenoxid verändert werden.

DIDING et al.⁷⁾ geben in ihrer Arbeit nur die Wertminderung der begasten Drogen gegenüber den Ausgangsdrogen an, ohne auf die Natur der chemischen Veränderung einzugehen.

In der Tabelle 10 sind die Ergebnisse dieser Arbeiten kurz gefaßt dargestellt.

Tabelle 10

1. Folia Belladonnae

Total alkaloids (as hyoscyamine) in *Folium Belladonnae* before and after treatment with ethylene oxide.

	Alkaloid		Optical rotation of the	
	% W/W		alkaloids from 25.00 g	
	duplicate		drug dissolved in CHCl ₃	
	analyses		to 10.00 ml (200 mm tube)	
			(duplicate analyses)	
Before treatment	0.4777	0.483	0.536	0.536
After treatment	0.422	0.437	0.462	0.480

2. Cortex Cinchonae

Total alkaloids (as quinine + cinchonidine) in *Cortex Cinchonae* before and after treatment with ethylen oxide.

	% W/W	
	duplicate	
	analyses	
Before treatment	8.20	8.24
After treatment	6.96	7.02

3. Opium

Morphine Content of Opium before and after treatment with ethylen oxide

	Alkaloid % W/W duplicate analyses	
Before treatment	15.4	15.7
After treatment	15.5	15.6

4. Cortex Frangulae

Determination of total glycosides and free aglycones in Cortex Frangulae before and after treatment with ethylen oxide

	Glycosides detd. as frangula-emodin % W/W		Free aglycones detd. as frangula-emodin % W/W	
Before treatment	5.00	5.17	0.23	0.22
After treatment	5.05	5.25	0.31	0.32

5. Cortex Rhamni purshianae

Determination of cascarosides, aloins and O-glycosides in Cortex Thamni purshianae before and after treatment with ethylen oxide

	Cascaroside (as cascario- side A) % W/W		Aloins (as barb- aloin) % W/W		O glycosides (as emodin- glycoside) % W/W	
Before treatment	8.51	8.90	0.49	0.39	0.58	0.68
After treatment	8.58	8.49	not detd.		not detd.	

6. Folium Sennae

Determination of sennosides, "aloins" and free anthraquinones in Folium Sennae before and after treatment with ethylenoxide

	Sennosides as sennoside A		Aloins as aloe-emodin		Free anthraquinones (as sennoside A)	
	%	W/W	%	W/W	%	W/W
Before treatment	2.36	2.49	0.120	0.111	0.102	0.096
After treatment	2.24	2.30	0.125	0.127	0.088	0.087

Aus den Untersuchungen von LIST und TERLINDEN¹⁵⁾ über die Begasung von Mutterkornpulver mit Äthylenoxid geht hervor, daß im Falle der Lysergsäurealkaloide eine β -Hydroxyäthylisierung am Stickstoff des Ringes D einsetzt. Die so entstandenen quartären Basen spalten nach A. HOFFMANN zu den sogenannten Desbasen auf, die ihrerseits stark lichtempfindlich sind.

Es ist anzunehmen, daß auch andere Drogeninhaltsstoffe mit aktivem Wasserstoff derart mit Äthylenoxid reagieren (siehe dazu FRÄNKEL, CONRAT)¹⁶⁾.

Auf Grund der ungenügenden Keimzahlminderung, mehr aber noch wegen der Umsetzung der Inhaltsstoffe kommt somit eine Äthylenoxid-Begasung als keimreduzierende Maßnahme nicht in Frage.

Ein in der Getränkeindustrie bisher mit Erfolg eingesetztes Chemosterilans ist der unter dem Namen "Baycovin" im Handel befindliche Pyrokohlensäurediäthylester.

Die Verbindung, eine klare, leichtbewegliche Flüssigkeit, wird in Konzentrationen von 6 - 12 ccm pro 100 Liter alkoholfreier, CO₂-haltiger Erfrischungsgetränke zugesetzt. In den bisher vorliegenden Publikationen¹⁷⁾ wird bei weitgehend vorgeklärten Weinen mit unvergorenem Zucker ein Zusatz zwischen 50 und 300 mg/l empfohlen.

Baycovin tötet Hefen, Bakterien, Schimmel, wobei die Aus-

gangskeimzahl 500/ml keinesfalls übersteigen sollte.

Überschüssiger Pyrokohlensäureester wird durch Wasser bei 20 ° C und einem pH-Wert von 4,5 innerhalb 6 Stunden vollständig zu Äthanol und Kohlendioxid hydrolysiert.

Da Pyrokohlensäureester aber mit Aminen, Carbonsäuren und Phenolen sowie anderen H-aciden Verbindungen reagiert und dabei u.a. Urethane entstehen, ist Baycovin jüngst in Mißkredit geraten, so daß auch diese Verbindung nicht mehr für die Keimreduzierung in Frage kommt¹⁹⁾.

Andere Bakterizide, die in entsprechender Konzentration oft als Konservierungsmittel eingesetzt werden, verbieten sich schon deshalb, weil sie in antimikrobiell wirksamer Menge physiologisch nicht unbedenklich sind.

Physikalische Maßnahmen

Zu den physikalischen Maßnahmen der Keimzahlverminderung gehören:

- 1a die Langzeitbehandlung mit trockener Hitze, mit strömendem oder gespanntem Wasserdampf,
- 1b die Tyndallisation,
- 1c die Kurzzeit-Ultrahoch-Erhitzung (Uperisation),
- 2. die Behandlung mit ionisierenden Strahlen
(a mit UV-Strahlen; b mit β - oder γ -Strahlen),
- 3. im Falle flüssiger Güter die Keimfiltration
 - a durch Membranen
 - b durch Filterschichten.

Bei den Untersuchten Produkten handelt es sich um tassenfertige Wirkstoffextrakte, die letztlich durch Sprühtrocknung erhalten werden. Der Grund für die Anwendung der wirtschaftlich aufwendigen Zerstäubungstrocknung ist das Bestreben, die Pflanzeninhaltsstoffe möglichst in ihrer genuinen Zusammensetzung und Beschaffenheit über die gesamte Extraktion bis hin zum Fertigprodukt zu erhalten. Darüber hinaus muß das Fertigprodukt klar wasserlöslich sein. Würde an irgendeiner Stelle des Produktionsganges eine länger andauernde Erhitzung auf 100 ° C oder darüber als durchaus wirksame Maßnahme zur Keimreduzierung eingeschaltet werden, so bestünde die Gefahr der chemischen oder physikalisch-chemischen Veränderung der Inhaltsstoffe. Die in der Entkeimung allgemein üblichen Hitze-sterilisationsverfahren kommen sowohl aus diesen als auch aus wirtschaftlichen Gründen nicht in Frage, denn in der Produktion sind Ansätze von mehreren Tagestonnen zu verarbeiten. Aus dem gleichen Grund verbieten sich auch Maßnahmen, die der Tyndallisation entsprechen. Es wäre möglich, durch Erhitzung der Auszüge auf 80 ° C vegetative Formen der Mikroorganismen abzutöten, den Ansatz über 24 Stunden zur Auskeimung vorhandener Sporen stehen zu lassen, ihn erneut auf 80 ° C zu er-

hitzen und dieses Verfahren solange durchzuführen, bis alle Sporen in vegetative Formen übergegangen und diese abgetötet sind. Dadurch käme es jedoch zu einer erheblichen Verzögerung des Produktionsablaufes, außerdem wäre es technisch nicht sehr leicht, die großen Ansätze in annehmbarer Zeit auf Temperaturen von nicht mehr als 80°C zu erhitzen.

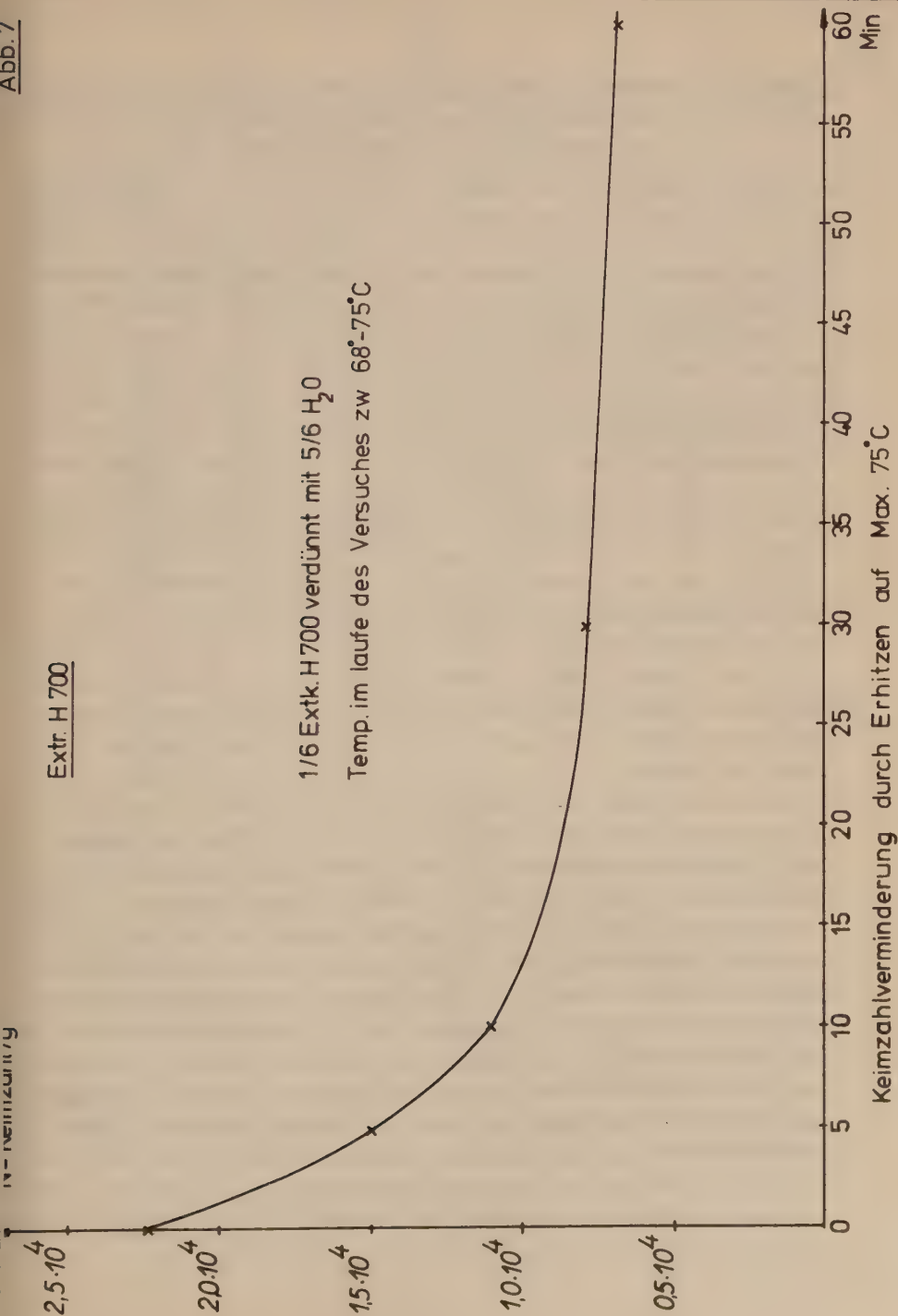
Obendrein würden thermophile Keime dabei nicht erfaßt werden.

Eine einmalige, auch langdauernde Erhitzung auf Temperaturen bis zu 75°C führte bei den untersuchten Extrakten zu nur unbefriedigenden Ergebnissen. Abb. 7 zeigt die Abnahme der Ausgangskeimzahl in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer. Zu bemerken ist, daß diese Versuche nur bei einem im Verhältnis 1 + 5 mit Wasser verdünnten Zwischenprodukt möglich sind. Wird das Konzentrat selbst erhitzt, so treten chemische und physikalische Veränderungen auf. Bei etwa 95°C wird die Masse gummiartig, hellt sich auf und ist in Wasser nicht mehr löslich.

Von den thermischen Behandlungen bleibt somit nur die Kurzzeit-Ultrahoch-Erhitzung, wie sie z.B. bei Frischmilch angewendet wird (ULLMANN)¹⁹⁾. An der Herstellungsstätte 2 wurde die zum Sprühtrocknen vorbereitete Lösung durch einen in die Steigleitung eingeschalteten Uperisator (Fa. Holstein-Kappert, Dortmund) ultrakurz hoch erhitzt und anschließend sofort getrocknet. Abgesehen von der z.T. nur unbefriedigenden Keimzahlverminderung (siehe Tab. 11) wurden die Wärmeaustauscherplatten innerhalb kürzester Zeit so stark mit Niederschlägen belegt, daß der Prozeß zur Reinigung häufig unterbrochen werden mußte.

Extr. H 700

1/6 Extrk. H 700 verdünnt mit 5/6 H₂O
Temp. im Laufe des Versuches zw 68°-75°C



Keimzahlverminderung durch Erhitzen auf Max. 75°C

Tabelle 11: Keimzahlen von Extraktproben H 700 und H 740
(jeweils inkl. Zuschlagstoffe) vor und nach
einer Kurzzeit-Ultrahoch-Erhitzung

	H 700	H 740
	Keimzahl/g T.S.	
vor Erhitzung	9×10^6	$2,2 \times 10^8$
nach Erhitzung	6×10^2	$3,3 \times 10^4$
nach Zusatz ätherischer Öle (tassenfertiger Tee)	10^2	$8,3 \times 10^3$

Damit dürften die thermischen Verfahren zunächst ausscheiden.

Wegen des technischen und wirtschaftlichen Aufwandes kam von den Verfahren mit ionisierenden Strahlen allenfalls die UV-Bestrahlung in Frage.

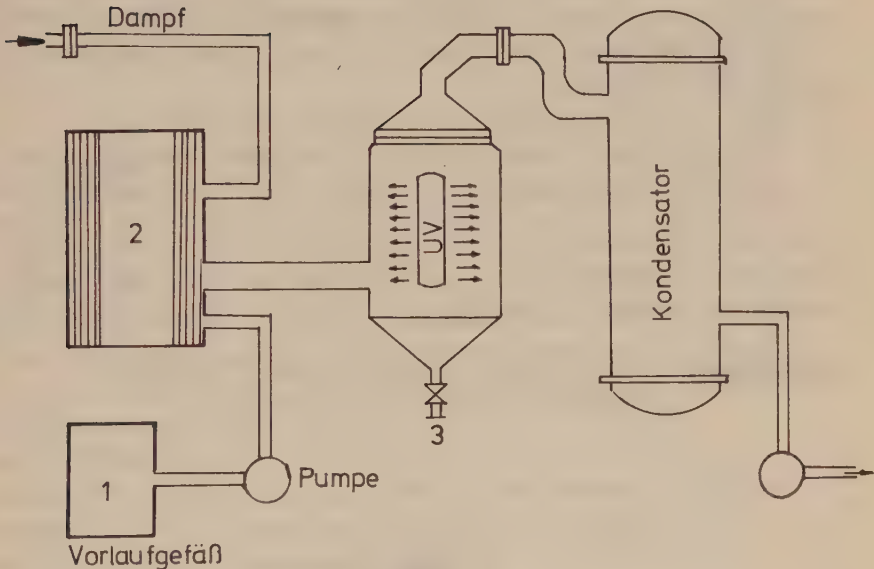
Um mit ihrer Hilfe zu einer entscheidenden Keimzahlreduzierung zu gelangen, mußte man im Laufe der Produktion an einer geeigneten Stelle das ganze Produkt unter Einwirkung der Strahlen setzen.

Bei kontinuierlich fließenden Flüssigkeiten (Extraktlösungen) ist die Einwirkung der Strahlen um so höher, je dünner die Flüssigkeitsschicht, je größer die Einwirkungsdauer und schließlich je höher die Intensität der Strahlen ist.

Demzufolge wäre ein UV-Brenner am besten in der Längsachse des Expansionsgefäßes (Abscheider) eines Dünnschichtverdampfers anzubringen (s. Abb. 8). In diesem Gefäß (3) fließt der aus dem Plattenverdampfer (2) kommende Extrakt als dünner Film an der Wandung spiralg nach unten. Die Verweilzeit beträgt je nach Durchsatz einige Sekunden. Die Temperatur des Gutes liegt bei etwa 80°C und würde die keimmindernde Wirkung der Strahlen unterstützen.

Abb. 8

Schema einer Versuchsanordnung zur
UV-Bestrahlung von Extrakten



Die Wirkung von UV-Strahlen auf den Keimgehalt der zu untersuchenden Extrakte wurde zunächst im Modellversuch geprüft. Dazu wurden nacheinander Spissum-Extrakte von H 700 und H 740 auf einer 30 x 10 cm großen Glasplatte als dünner Film der Wirkung einer im Abstand von 25 cm angebrachten UV-Lampe (Camag Universal) ausgesetzt. Vom bestrahlten Material wurde nach jeweils einer Minute eine Probe zur Keimzahlbestimmung entnommen. Selbst nach einer Bestrahlungszeit von 5 Minuten, die in praxi im Verdampfer nie erreicht werden könnte, konnte keine wesentliche Keimzahlverminderung festgestellt werden. Sicherlich hätten bei Einsatz leistungsstärkerer UV-Brenner bessere Ergebnisse erwartet werden dürfen, doch besteht hier, abgesehen vom technischen Aufwand, die

Gefahr, daß die Inhaltstoffe der Extrakte verändert werden würden. Somit schied auch diese Maßnahme aus.

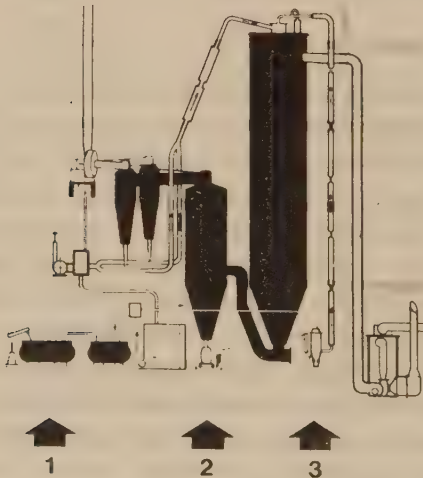
Da alle bisher besprochenen Maßnahmen in der Praxis entweder aufgrund gesetzlicher Bestimmungen nicht angewendet werden durften oder aus Mangel an Wirksamkeit oder wegen des nicht tragbaren technischen Aufwandes nicht in Frage kamen, blieb als letzte der zu prüfenden Maßnahmen die Keimfiltration.

Der Filtrationsprozeß müßte so in den Produktionsgang eingeschaltet werden, daß

1. die Filtrationsleistung ausreichend hoch wäre und
2. nach der Keimzahlverminderung im weiteren Produktionsablauf keine nennenswerte Rekontamination erfolgen könnte.

Punkt 2 wäre am besten dadurch erfüllt gewesen, daß die Filtration unmittelbar vor der Sprühtrocknung des endgültigen Gemisches erfolgt (siehe Abb. 9, Pfeil 3). Dies scheiterte je-

Abbildung 9: Schematische Darstellung des Produktionsablaufes in Herstellungsstätte 2



doch an der zu hohen Viskosität der Extrakte. Wie bedeutungsvoll der Viskositätsgrad für die Filtrationsleistung ist, sei am Beispiel des Versuches zur Abbildung 10 gezeigt, in welchem die Abhängigkeit der Durchflußmenge von Glucose- bzw. Polyäthylenglykol-Lösungen von deren Viskositäten untersucht worden ist: Während z.B. bei einer Viskosität von 1 cSt ein Durchfluß von 3200 ml/min zu verzeichnen war, betrug er bei 3 cSt nur noch die Hälfte, und zwar (begreiflicherweise) ohne Rücksicht auf die Art der Lösungen. Demzufolge mußte die Filtration dort vorgenommen werden, wo die geringste Viskosität vorlag, nämlich am Perkolatorauslauf, also bei der ursprünglichen Miscella. Dies hat zudem den großen Vorteil, daß zu diesem Zeitpunkt die Miscella thermisch noch nicht beansprucht ist und somit viel weniger Koagulate enthält als die späteren Spissumextrakte, selbst wenn man diese entsprechend verdünnen würde. Im Falle einer solchen Filtration müßte allerdings darauf geachtet werden, daß zur Vermeidung einer Rekontamination die weitere Herstellung bis zum Endprodukt unter einwandfreien hygienischen Bedingungen erfolgt.

Die Filtrationsleistung ($l/h \times m^2$) ist natürlich von Drogenauszug zu Drogenauszug verschieden. Die Gemische H 700 und H 740 sind jedoch so zusammengesetzt, daß praktisch alle Schwierigkeitsgrade vertreten waren.

Für die Keimfiltration stehen heute zwei Arten von Filtermaterialien zur Verfügung: Membran- und Schichtenfilter. Die Wirkung der ersteren beruht auf einem reinen Siebeffekt (Oberflächenfiltration); d.h. es werden nur solche Teilchen zurückgehalten, deren kleinster Durchmesser größer als der der größten Porenweite ist.

Schichtenfilter wirken aufgrund der Prallabscheidung und vorwiegend durch Adsorption in der Filterschicht (Tiefenfiltration).

Selbst bei guter Vorklärung der Miscella über einfache Klärfilterschichten wurden Membranfilter mit maximalen Porenweiten von $0,45 \mu m$ in kürzester Zeit vollständig verstopft. Laborversuche mit größerer Porenweite ($0,8 \mu m$) ergaben keine

nennenswert besseren Ergebnisse. Gute Standzeiten erzielten wir hingegen mit EKS-Schichtenfiltern, die zudem eine recht befriedigende Keimadsorption zeigten. Die Ergebnisse eines solchen Laborversuches mit Miscellen von Extrakt H 700 sind in der Tabelle 12 wiedergegeben.

Tabelle 12: Keimzahlen zweier Miscellaquoten einer H 700-Probe vor und nach EKS-Filtration

Miscellaquote	vor Filtration	nach Filtration
	Keimzahl / g T.S.	
Radix Althaeae	10^{12}	$1,2 \times 10^3$
Lichen Islandicus mit Folia Farfarae	5×10^6	<10

Durch diese EKS-Filtration verminderte sich der sehr hohe Keimgehalt von Radix Althaeae von über 10^{12} Keimen auf rund 10^3 /g T.S. Dieser Keimrestgehalt war vermutlich durch die relativ geringe Adsorptionskapazität des gewählten kleinen Filters bedingt, so daß Keime durchbrechen konnten. Bei der wesentlich keimärmeren Miscella von Lichen Islandicus und Folia Farfarae war dies nicht der Fall. Im hierauf angeschlossenen praktischen Versuch an der Anlage der Produktionsstätte 1 ergaben sich die in Tabelle 13 aufgeführten Keimzahlen. Diese Bestimmungen betrafen eine H 700-Probe vor und nach EKS-Filtration sowie den resultierenden Spissum-Extrakt. Es zeigte sich, daß bei Beachtung üblicher hygienischer Vorkehrungen bis zum Endprodukt keine zu beanstandende Keimvermehrung oder Rekontamination auftrat. Die bei diesen Versuchen festgestellte beträchtliche Keimreduzierung steht in sehr guter Übereinstimmung mit den von Professor Dr. BORNEFF, Hygiene-Institut der Universität Mainz, an der gleichen Extrakt-Charge erhaltenen Ergebnissen.

Abb. 10

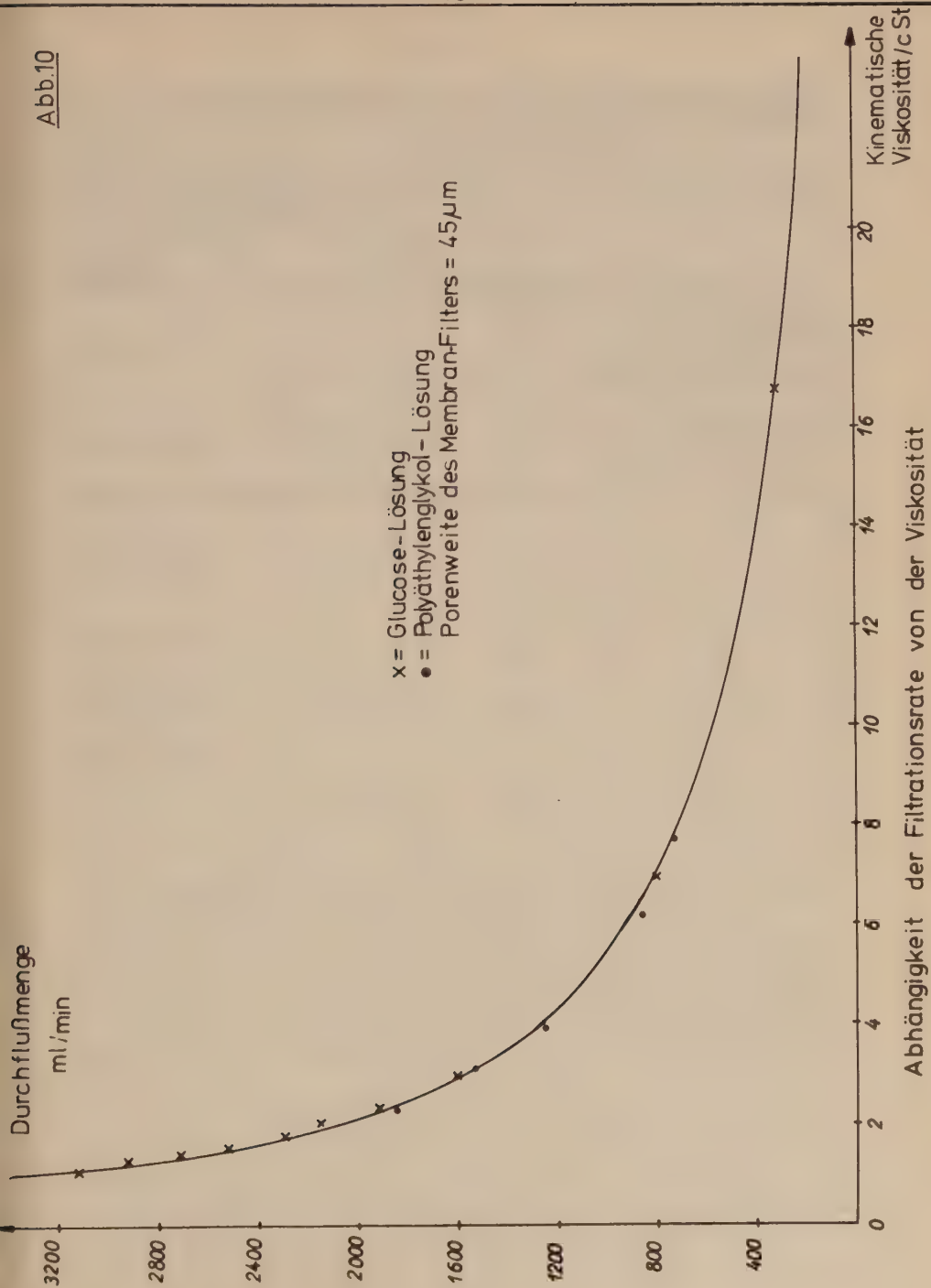


Tabelle 13: Keimzahlen einer H 700-Probe während des Produktionsablaufs

	Keimgehalt/g T.S.	
	eigene Befunde	Befunde von Prof. BORNEFF
vor EKS-Filtration (Miscella)	3×10^6	10^6
nach EKS-Filtration (Miscella)	< 10	.
nach Einengung im Verdampfer (Spissum-Extrakt)	230	580

Die Gefahr der Adsorption von Wirkstoffen durch das Filtermaterial ist gering. Untersuchungen von ASCHE und STEIGER-TRIPPI²⁰⁾ haben dies eindeutig gezeigt. Dies stimmt auch überein mit Angaben von H. WILKE²¹⁾ (siehe Tabelle 14) und einigen eigenen Versuchen.

Tabelle 14 Adsorption von Arzneistoffen in EKS
Seitz-Filterschichten (nach H. WILKE)

Arzneilösung	Analytisch bestimmter Gehalt in 100 cm ³		Konzentrations- änderung	
	Original Lösung g	Filtrat g	in mg/3 100 cm ³ mg	in %
2prozentige Äthylmorphin Lösung	1,824	1,816	- 8	- 0,44
1prozentige Novokainlösg.	1,061	1,059	- 2	- 0,19
0,1prozentige Atropinlösung	0,0961	0,0965	+ 0,4	+ 0,04
0,02prozentige Strophantin- lösung	0,0252	0,0246	- 0,6	- 2,4

Die festgestellten Konzentrationsabweichungen der Filtrate liegen innerhalb der analytischen Fehlergrenze.

Nachteilig könnte sich allenfalls ein geringer Verlust an Trockensubstanz erweisen, der durch den extremen Kläreffekt der Keimfiltration hervorgerufen wird. Dieser wiederum führt jedoch zu absolut blanken Filtraten.

VIII. Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß es ohne großen technischen Aufwand möglich ist, auch stark mikrobiell verunreinigte Drogenauszüge auf Keimzahlen zu bringen, die von den maßgebenden Gremien toleriert werden, ohne dabei die Inhaltsstoffe zu beeinträchtigen.

In der vorliegenden Arbeit sind nur die zu tassenfertigen Wirkstoffextrakten verwendeten Drogenbeispiele ausgewählt worden, weil diese aus den bereits genannten Gründen besondere Schwierigkeiten bieten. Bei Extrakten, die mit organischen Lösungsmitteln hergestellt werden und deren Ausgangsdrogen andere Inhaltsstoffe haben, dürften die Keimzahlen andere sein.

Die Arbeit begleitend wurden deshalb nach und nach die meisten der in Produktionsstätte 1 hergestellten Extrakte auf ihre Keimzahlen überprüft. Von den mehr als 30 geprüften Extrakten zeigen einige konstant sehr niedrige Keimzahlen. Das sind in erster Linie die Anthrachinondrogenextrakte. Dies dürfte sich vielleicht dadurch erklären lassen, daß mikrobielles Wachstum mit einer Reduktion des Substrates einhergeht, wodurch Anthrachinone in die bakterizid wirksamen Anthranole übergeführt werden. Viele der niedrigen Keimzahlen sind sicherlich auf antimikrobiell wirksame Herstellungsschritte (Verwendung organischer Lösungsmittel, Erhitzen der Produkte u.a.) zurückzuführen. Unerklärlich sind die bei wiederholten Bestimmungen oft schwankenden Ergebnisse (siehe Tab. 15) an verschiedenen Chargen gleicher Extrakte.

Es scheint angebracht, die Untersuchungen fortzuführen, um dabei evtl. noch unbekannte bakterizid wirksame Drogeninhaltsstoffe aufzufinden.

Aus all dem geht hervor, daß die Wahl der Maßnahmen zur Keimzahlverminderung fallweise getroffen werden muß. Einige der Drogenauszüge bedürfen keiner besonderen Behandlung, während andere durch Filtration evtl. aber auch durch Uperisation oder andere Maßnahmen entkeimt werden müssen.

Tabelle 15: Keimgehalt von verschiedenen Extraktproben

Extrakt	Keimzahl/g	Inhaltsstoffe
Frangulae Sicc.	<10 <10 $5,0 \times 10^1$	das Glykosid Glukofrangulin und Frangulin, ferner freies Frangula-Emodin, Isoemodin und Chrysophansäure u.a. Anthrachinonderivate. Saponin, Bitterstoff und Gerbstoff
Cascarae Sicc. = Cortex Rhamni Purshianae	<10	wie bei Frangula, aber in etwas geringerer Menge
Rhei Sicc.	$1,5 \times 10^1$	enthält das sowohl abführende als auch adstringierende Rheopurgarin, ein Komplex von 4 Anthraglykosiden. Adstring. = Tannoglykoside, Glukogallin u. Tetrarin, Gallussäure, Stärke, Zucker, Pektin, Oxalsäure
Aloe Sicc. DAB 7	$7,5 \times 10^1$	Oxyanthrachinonderivate: Aloin (Barbaloin, β -Barbaloin) Aloe-Emodin, Aloetin, bis ca. 40 % Harz
Sennae Sicc.	$3,0 \times 10^1$ $7,5 \times 10^3$ $1,2 \times 10^4$	Die Anthrachinonderivate Rhein, Aloe-Emodin, Iso-Emodin, Chrysophanol und ihre Glykoside
Crataegi e fruct. Sicc. 1+1	$7,0 \times 10^1$ $8,5 \times 10^1$ $2,0 \times 10^2$	Crataegus-Lacton, Crataegolsäure, Chlorogensäure, Aesculetin, Guanin, Adenin, Acetylcholin, Cholin, herzwirksame Hyperosid, Quercitin, Vitexin
Crataegi e Herba Sicc.	<10	wie oben
Crataegi e fruct. Sicc. mit Träger Substanz 1+1 verd.	$5,3 \times 10^4$	wie oben

Extrakt	Keimzahl/g	Inhaltsstoffe
Visci alb. aq. Sicc.	2,0x10 ³ 2,9x10 ³	Viscotoxin, Acetylcholin, Cholin, Viscin, Viscinsäure, Harzalkohole, Visciresinol, α -Viscol, β -Viscol, Oleanol- säure, Inosit, Urson
Convall. maj. Sicc. 1,1% alkohol.	9,4x10 ³	wie oben
Fuci Vesic. aquos. Sicc.	1,1x10 ³ 1,3x10 ³ 4,3x10 ³	Jod, Brom, β -Carotin, Caro- tinoid, Farbstoffe, Fuco- xanthin, Xanthophyll, Algin- säure, Fucoidin, Laminarin, Schleim, Zucker
Hippocastani e Sem. Sicc.	3,3x10 ² 6,8x10 ² 7,0x10 ²	Stärke, Eiweiß, Bitterstof- fe, Fett, Öl, Gummi, Gerb- stoffe
Belladonnae	<10 5,0x10 ² 1,2x10 ³	L-Hyoscyamin, Atropin, Cholin, Scopolamin, Belladonnin, N- Methylpyrrolidin, Pyridin Gerbstoffe, Bernsteinsäure
Colae Sicc. EB 6	<10 7,0x10 ¹	0,6 - 2,5 % Koffein ca. 0,023 % Theobromin, Gerb- stoffe, Stärke, Fett, Cola- catechin u. Koffeincolaca- techin
Colae Gemisch ca. 1,0 % Koffein Sicc.	2,0x10 ¹ 7,5x10 ¹	wie oben, mehr Koffein
Betula aquos. Sicc.	<10 3,5x10 ¹ 3,1x10 ⁹	Vanillin, Salicylaldehyd, Piperonal, Heliotropin u. Dimethylsalizylat
Valerianae Sicc.	<10 5,0x10 ¹ 8,5x10 ⁴	Ätherische Öle, Ester der Isovaleriansäure

Extrakt	Keimzahl/g	Inhaltsstoffe
Chelidonii Sicc.	< 10	Chelidonin, Chelerythrin, α.B.γ., Homochelidonin, San- guinarin, Chelidoxanthin, Pro- topin, Allocryptopin, Spar- tein, Chelidonsäure, Zitro- nensäure, Enzyme
Cardui mar. fruct. Sicc.	$3,1 \times 10^2$	Cnicin = Sesquiterpen 8 % Gerbstoffe, Schleim sehr viel
Humuli Lup. e flor. aq.	< 10 $6,2 \times 10^3$	Humulon = stark bitteres Harz = (Phloroglucinderivat)
Cynosbat.	$4,0 \times 10^1$ $6,1 \times 10^2$	L-Ascorbinsäure, Carotinoide, 3,5 % Äpfel-u.Citronensäure u. 10 % Zucker
Agrimoniae comp. Sicc. 1,5	$1,5 \times 10^5$	Gerbstoff, Bitterstoff, äth. Öl, Kieselsäure, Nikotinsäu- reamid
Agrimoniae fluid.	$4,0 \times 10^1$	wie oben
Thymi fluid. DAB 7	$5,0 \times 10^1$	Ätherische Öle, Thymol und Carvacrol, Ursol und Olean- säure, Kaffeesäure
Fel. tauri dep. Sicc.	< 10 $1,6 \times 10^2$	Taurocholsaures und Gallen- saures Natrium, Lecithin und Cholesterin
Ipecacuanhae fluid.	< 10	0,6 - 2 % Emetin, 0,5 - 0,8 % Cephaelin
Resina Jalapae	$2,0 \times 10^2$	95 % Convolvulin, ferner Ipur- ganol, β-Methylaesculetin, Palmitin, Stearin-, Butter-, Ameisen-, Linol., Convolvulin- säure
Resina Scammoniae	$1,5 \times 10^5$	enthält ca. 70 % Scammonin (Glykosid)

Extrakt	Keimzahl/g	Inhaltsstoffe
Meliloti Spissum	$4,0 \times 10^5$	Cumaringlykoside und Melilotin, ferner Schleim, Harz, Cholin
Orthosiphonis Sicc.	$3,0 \times 10^1$	Orthosiphonin (Glykoside), äth. Öl, Saponin, Gerbstoffe
Kawa-Kawa	$8,5 \times 10^2$	Kawain, Dihydrokawain, Methysticin, Dihydromethysticin, Yangonin
Ononidis e rad. Sicc.	$1,1 \times 10^3$	Äth. Öl, Ononin (Glykosid), Onospin, Gerbstoff
Leonuri Card. Sicc.	$3,6 \times 10^3$	Leonurin (Bitterstoff), Gerbstoff, Zucker, äth. Öl, Harz
Senegal virg. Spiss.	$1,0 \times 10^2$	10 % Senegin (Saponin), Polygalasäure, Salizylsäure sowie Salizylsäure- u. Baldriansäuremethylester, Fett, Öl, Zucker

VIII. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden sogen. tassenfertige Wirkstoffextrakte auf ihren Keimgehalt geprüft. Um nach einer möglichst wirksamen Methode zur Verminderung der Endkeimzahl/g zu suchen, mußten die Keimzahlen der Ausgangsdrogen und die sämtlichen Zwischenstufen der Herstellung erfaßt werden. Außerdem war es nötig, die Keimarten kennenzulernen, um von da aus auf die Wirksamkeit zu ergreifender Maßnahmen schließen zu können. Diese Untersuchung brachte zudem den Beweis, daß keine pathogenen Keime vorlagen.

Von den zahlreichen theoretisch möglichen Maßnahmen zur Keimzahlverminderung erwies sich letztlich nur die Keimfiltration durch Schichtenfilter als technisch brauchbar. Die sicherlich noch einsetzbare Methode der Ultrakurzzeit-Hocherhitzung stand für die vorliegenden Versuche nicht ausreichend zur Verfügung.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, ist es ohne zu großen Aufwand möglich, auch tassenfertige Wirkstoffextrakte in der geforderten mikrobiologischen Qualität herzustellen.

Neben diesen grundsätzlichen Untersuchungen wurden Keimzahlbestimmungen an zahlreichen handelsüblichen Extrakten durchgeführt, die zeigen, daß in vielen Fällen so keimarme Produkte anfallen, daß keine weitere Maßnahme zur Keimreduzierung erforderlich ist.

IX. Beschreibung der Versuche

1. Beschreibung der mikrobiologischen Versuche

Bei diesen mikrobiologischen Untersuchungen sind die hierfür erforderlichen hygienischen Bedingungen eingehalten worden. Sämtliche mit dem Untersuchungsgut in Berührung kommenden Materialien, Glaswaren oder sonstigen Gegenstände sind teils im Heißluftschrank, teils im Autoklaven sterilisiert worden. Auch ist darauf geachtet worden, daß keine Kontamination mit Luftkeimen erfolgte.

1.1. Art und Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials

Die von der Produktionsstätte 1 erhaltenen Spissumextraktproben von 6 verschiedenen Chargen (3 von Extrakt H 700 und 3 von Extrakt H 740) befanden sich in braunen 50-ml-Weithalsflaschen mit Schraubverschluß. Die Extrakte sind in den Sommermonaten hergestellt und mir einige Wochen später vom Hersteller übergeben worden.

Um möglichst eine Vermehrung der vorhandenen Keime zu verhindern, sind die Extrakte ständig im Kühlschrank bei $+5^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt worden. Die Spissum-Extrakte sind unmittelbar an der Produktionsstätte 2 auf deren Keimzahl untersucht worden. Die Ausgangsdrogen sind bis zur Untersuchung bei Raumtemperatur aufbewahrt worden.

1.2. Herstellung und Zusammensetzung der Nährmedien

Je nach dem Untersuchungszweck sind verschiedene halbstarre und flüssige Nährmedien benutzt worden.

A.) Zur Keimzahlbestimmung (Keimgußplatten-Verfahren) verwendeten wir das Fertignährmedium CASO-Bouillon (Casein-pepton-Sojamehlpepton-Bouillon, Merck, Art.Nr.5459) mit Zusatz von Agar-Agar (Merck, Art. Nr.1614).

30 g des Mediums und 15 g Agar-Agar wurden in 1 Liter

destilliertem Wasser aufgenommen, 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen und bis zum vollständigen Auflösen im Dampftopf gekocht. Anschließend wurde im Autoklaven (15 Minuten bei 121°C) sterilisiert. Bis zur späteren Verwendung wurde das Agarmedium im Wärmeschrank bei etwa 55°C flüssig gehalten.

B.) Zur qualitativen Bestimmung der Keime stellten wir Agaroberflächen-Kulturen her, wofür wir folgende Agarnährmedien verwendeten:

Blut-Nähragar (nach Rezeptur des Hygiene-Instituts Marburg) als Universalmedium mit folgender Zusammensetzung:

Natriumchlorid	6,0 g	(Merck, Art. Nr.6404)
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	2,0 "	(" " " 6580)
Witte Pepton	10,0 "	(Oxoid " " L 49)
Agar-Agar	10,0 "	(Merck " " 1614)
Fleischextrakt	8,0 "	(Oxoid " " L 29)
Aqua dest.	1000 ml	

Das Medium wurde mittels NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert von 7,3 - 7,4 eingestellt und 15 min autoklaviert (121°C). Nach Abkühlung auf etwa 55°C wurde dem noch flüssigen Agar etwa 5 % defibriniertes frisches Hammelblut beigemischt, hierauf unter aseptischen Bedingungen in Portionen zu 12 - 14 ml in sterilen Petrischalen (Ø 9 cm) gegossen und nach Erstarren bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Trypticase Soy Agar (Difco, Art. Nr.586276)

40 g dieses Fertigmediums (Universal-Nährboden) wurden in 1 Liter destilliertem Wasser suspendiert und 15 min eingeweicht (pH = 6,9). Anschließend wurde das Nährsubstrat bis zur völligen Lösung im Wasserbad erhitzt, 15 min im Autoklaven (121°C) sterilisiert und sodann in Platten gegossen.

C.) Endo-Agar (Oxoid Best.Nr. CM 37)

Von diesem speziell dem Nachweis von Enterobacteriaceae dienenden Fertignährboden wurden 36,5 g in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Die Sterilisation erfolgte im Autoklaven

(15 min bei 121°C). Die fertig gegossenen Petrischalen wurden unmittelbar danach bis zur Verwendung im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

D.) Sabouraud-Maltose-Agar (Merck, Art. Nr.5439)

Zum Nachweis von Pilzen, speziell von Schimmelpilzen:

65 g des Fertignährbodens suspendierten wir in 1 Liter destilliertem Wasser. Nach 15 min Einweichen wurde bis zur vollständigen Lösung gekocht. 15 min bei 121°C autoklaviert und hier-nach (zur Vermeidung von Caramelbildung) rasch auf etwa 55°C abgekühlt und in Petrischalen gegossen. pH-Wert bei 22°C=5,6. Zur Isolierung pathogener Pilze sind außerdem mittels 10%iger Natronlauge Platten mit pH-Wert von 10,2 bis 10,5 hergestellt worden, wobei zur Unterdrückung von Bakterienwachstum 1 Liter dieses auf 50°C abgekühlten Nährbodens unter aseptischen Bedingungen 20 000 I.E. Penicillin und 40 mg Streptomycin beigegeben worden sind.

Zur biochemischen Charakterisierung und Unterscheidung der verschiedenen Bacillenspezies verwendeten wir nachstehende 9 flüssige und 2 halbstarre Differentialnährmedien ("Bunte Reihe"), die in ihrer Zusammensetzung und Herstellung den angeführten Referenzpräparaten entsprachen. [Die verschiedenen Nährsubstrate sind jeweils in Mengen von etwa 3-5 ml in Reagenzgläser (Kulturröhrchen) abgefüllt, mit Wattestopfen versehen und 15 min bei 121°C sterilisiert worden.]

a) Glucose (Merck, Art. Nr.8342) (0,5%)-Bouillon mit einem Gehalt von 0,5% NaCl und 1,0% Pepton aus Casein (Merck, Art. Nr.8338). Als Indikator für erfolgten Zuckerabbau (Säuerung) waren 0,2% einer wäßrigen Bromthymolblaulösung 1/500 zugegeben worden, die im positiven Fall nach Gelb umschlug. pH-Wert bei 37°C: 7,3

b-d) Entsprechend wurden Bouillons mit 1,0% Arabinose (Merck, Art. Nr.1492), 1,0% Mannit (Merck, Art. Nr.5980) bzw. 0,2% Stärke (Merck, Art. Nr.1257) an Stelle von Glucose hergestellt.

e) Zum Nachweis von mikrobiellem Wachstum mit Citrat als ausschließlicher Kohlenstoffquelle diente die vollsyntheti-

sche Citrat-Nährlösung nach KOSER (Merck, Art. Nr.2500). Bakterienwachstum äußert sich in einer Trübung des Nährbodens.

f) Die Eigenschaft, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, prüften wir mittels der Nitrat-Bouillon (Merck, Art. Nr.10204) und Griess-Ilosways Reagens auf Nitrit (Merck, Art. Nr.9023).

g) Wegen seines hohen Tryptophangehalts eignete sich die gleiche Nährbouillon auch zum Nachweis von Indolbildung mittels Kovacs Indolreagens (Merck, Art. Nr.9293).

h) Um nachzuweisen, ob aus Glucose Acetylmethylcarbinol gebildet wird, verwendeten wir die Methylrot-Voges-Proskauer-Bouillon (Oxoid, L 49). Der Nachweis dieses Stoffwechselprodukts erfolgte mittels 0,6 ml -Naphthol (5% -Naphthol in absolutem Äthanol) und 0,2 ml wäßriger 40%iger KOH-Lösung. Eine starke rote Färbung zeigte die positive Reaktion an.

i) Das Vermögen mancher Bakterien, Harnstoff durch das Enzym Urease zu Ammoniak zu hydrolysieren, äußert sich in einer stark alkalischen Reaktion einer Harnstoff enthaltenden Bouillon (Merck, Art. Nr.8483), die durch einen Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot von Gelb nach Rot nachgewiesen wurde.

k) Zum Nachweis des Ferments Gelatinase verwendeten wir eine 12,8%ige Gelatine enthaltende Nährgelatine (Oxoid, CM 135 a). Durch Gelatinase-bildende Bakterien erfolgt ein proteolytischer Abbau der Gelatine, so daß sie bei Temperaturen zwischen 0 und +22°C nicht mehr erstarrt, sondern flüssig bleibt.

l) Um die Eigenbeweglichkeit der Mikroorganismen nachzuweisen, verwendeten wir ein dem Motility Test Medium (Difco, Art. Nr. B 105) entsprechendes Medium mit einem 0,4%igen Agargehalt. Dieses Medium läßt man als sogenannte Hochschicht in den Kulturröhrchen erstarren. Die Beimpfung des Röhrchens erfolgte mittels einer Nadel in die Tiefe der Hochschicht. Bei vorhandener Beweglichkeit zeigte sich eine diffuse Trübung um den Stichkanal, oder es wuchsen vom Stichkanal ausgehende seitliche Fortsätze.

Ergänzend sei angeführt, daß die Blutagarplatte gleichzeitig dazu diene, Katalase-bildende Bakterienspezies zu erfassen. Nach Zusatz von einem Tropfen 3%iger H_2O_2 -Lösung auf die Bakterienkolonien bildeten nur Katalase-positive Bakterien feine Bläschen (Katalase zerlegt Wasserstoffsuperoxid in Wasser und molekularen Sauerstoff).

1.3. Bakteriologische Färbungen

Zur morphologisch-färberischen Charakterisierung und Beurteilung sind von den verschiedenen Bakterienarten Objektträgerpräparate hergestellt worden. Hierzu wurde eine kleine Menge von einer Bakterienkolonie mittels eines Tropfens Wasser auf einen Objektträger zerrieben. Nach Lufttrocknung wurden die Objektträger (mit dem Keimauftrag nach oben) hitzefixiert, d.h. jeweils 3 mal langsam durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen. Es sind folgende 3 Färbungen angewandt worden.

a) Methylenblaufärbung diene als einfache und schnelle Oberschichtsfärbung. Hierzu wurden 30 ml einer gesättigten alkoholischen Lösung von Methylenblau mit einer Mischung von 1 ml einer 1%igen Kalilauge und 99 ml Wasser versetzt. Mit dieser Lösung wurde das Objektträgerpräparat überschichtet und nach 2 min mit Wasser abgespült und getrocknet.

b) Als Differenzialfärbung wurde die Gramfärbung benutzt, die eine Differenzierung der Bakterien in grampositive (dunkelblaugefärbte) und gramnegative (rotgefärbte) gestattet. Die hierzu erforderlichen 3 Farbreagentien wurden folgendermaßen hergestellt.

Karbolgentianaviolett: 10 ml einer gesättigten alkoholischen Gentianaviolett-Lösung werden mit 90 ml einer frisch bereiteten 2,5%igen wäßrigen Lösung von Phenol versetzt.

Lugol'sche Lösung: 1 g Jod und 2 g Kaliumjodid werden im Mörser unter Reiben in etwa 5 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mit Wasser auf 300 ml aufgefüllt.

Karbol-Fuchsinlösung: 10 ml einer gesättigten alkoholischen Fuchsinlösung werden mit 90 ml einer 5%igen Lösung von verflüssigtem Phenol (Phenolum liquefactum), die unter kräftigem Schütteln zubereitet worden ist, versetzt. 10 ml dieser Lösung werden mit 90 ml Wasser gemischt.

Die hitzefixierten Objektträgerausstriche werden 2-3 min mit Karbolgentianaviolett-Lösung gefärbt, mit Lugol'scher Lösung 1 min gebeizt, in 96%igem Alkohol entfärbt (bis das Präparat keine Farbwolken mehr abgibt), mit verdünnter Karbol-fuchsin-Lösung etwa 30 sec nachgefärbt, mit Wasser abgespült und getrocknet.

Die Zuordnung grampositiver, stäbchenförmiger Bakterien zur Gattung Bacillus setzte den Nachweis von Endosporen voraus. In den Fällen, wo dies nicht mittels der Methylenblau- oder Gramfärbung möglich war, führten wir folgende Sporen-färbung durch:

Der hitzefixierte Ausstrich wurde für 2 min mit 5%iger Chromsäure versetzt. Nach Abspülen mit Wasser wurde das Präparat für 2 min mit vorgenannter Karbol-fuchsinlösung überschichtet, wobei die Farblösung mit der reduzierten Bunsenflamme von unten 3 mal bis zum Dampfen (keine Blasenbildung!) erhitzt wurde. Nach Abspülen mit Wasser ist das Präparat mit 5%iger Schwefelsäure 10 sec entfärbt worden, bis es blaß-rosa erschien, worauf schnell abgesprüht wurde. Hierauf erfolgte eine Behandlung mit 1%iger Phosphormolybdänsäure für 10 sec. Nach sofortigem Abspülen ist das Präparat mit vorgenannter Methylenblaulösung 1 min lang nachgefärbt, abgespült und getrocknet worden. Die Sporen waren hiernach rot, die Bacillen-leiber blau gefärbt.

1.4. Keimzahlbestimmungen

Für die Keimzahlbestimmungen sind die gemäß 2.1. selbst hergestellten Extrakte der Ausgangsdrogen sowie 10%ige Spisum- und Siccum-Extrakte der Hersteller verwendet worden.

Als Verdünnungsmedium diente hierbei physiologische NaCl-Lösung, der 5% Tween 80 beigegeben worden war. Jeweils 1 ml dieser Ausgangsverdünnungen sowie fünf weiterer Verdünnungen (Verdünnungsfaktor 10) wurden in Petrischalen gegeben und mit rund 12 ml flüssigem auf etwa 50°C abgekühlten CASO-Nähragar gründlich gemischt. Nach 3tägiger aerober Bebrütung bei 37°C wurden durch Auszählung der geschilderten Kolonien die Keimzahlen pro Gramm Substanz ermittelt.

1.5. Anlegen der Primärkulturen und Gewinnung von Reinkulturen

Die vorstehend genannten Spissumextrakt-Lösungen sind mittels Öse auf Agarkulturmedien ausgestrichen worden, und zwar jeweils auf 2 (insgesamt 8) Petrischalen mit den Universalnährmedien Blutnähragar und Trypticase-Soy-Agar sowie den Differentialnährmedien Endo Agar und Sabourand-Maltose-Agar. Während die ersten 3 Medien 3 Tage lang bei 37°C bebrütet wurden, sind die letzteren Pilznährmedien 14 Tage lang bei 25°C kultiviert worden. Vertreter unterschiedlich erscheinender Bakterienkolonien sind zwecks Gewinnung von Reinkulturen auf frische Agarnährmedien isoliert und weiter kultiviert worden. Besondere Aufmerksamkeit galt hierbei der Isolierung der Komponenten bzw. Varianten von Mischkolonien. Mittels Färbungen ist gleichzeitig eine Diagnose der Gruppenzugehörigkeit der Bakterien versucht worden. Im Falle grampositiver Stäbchen, die keine Sporenbildung zeigten, sind die Kulturplatten bis zu 2 Wochen zwecks Versporung bei Raumtemperatur aufbewahrt und mittels der Sporenfärbung kontrolliert worden.

1.6. Identifizierung der Keime

Von den kulturell gewonnenen Reinkulturen wurden die verschiedenen Differentialnährmedien der "Bunten Reihe" beimpft. Bei den Bacillen dienten die biochemischen Ausfälle zusammen

mit der Form und Lagerung der Endosporen zu ihrer Identifizierung. Richtungsweisend waren hierbei die in den angegebenen Handbüchern und Literaturstellen enthaltenen Angaben sowie die Vergleichsbefunde der Referenzstämme.

2. Beschreibung der pharmazeutisch-technischen Versuche

2.1. Extraktion der Ausgangsdrogen:

Von jeder einzelnen, getrockneten Ausgangsdroge wurden genau 10,0 g im Mixbecher mit 300 ml destilliertem Wasser 5 min lang extrahiert. Sodann filtrierten wir durch einen sterilen Wattebausch, wobei dreimal mit je 50 ml Wasser nachgespült und der Rückstand abgepreßt wurde. Zum Zwecke der Keimzahlbestimmung wurden diese Auszüge mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

2.2. Probenahme während der industriellen Herstellung:

Die Entnahmen der Proben erfolgten unter Beachtung möglichst steriler bzw. aseptischer Bedingungen. Die verschiedenen mehr oder weniger stark eingeeengten Auszüge der Herstellungsstätte 1 wurden an verschiedenen Stellen der Produktionsanlage entnommen und unmittelbar hierauf im werkseigenen Laboratorium die Keimzahlbestimmungen durchgeführt. Die gleichen Untersuchungen geschahen an verschiedenen Stellen der Herstellungsstätte 2, wobei die verschiedenen Zuschlagstoffe - wegen ihrer Keimarmut in möglichst hoher Konzentration - miteinbezogen worden sind.

2.3. Herstellung des Extraktes H 700 am Pharmazeut.-technolog. Institut der Univ. Marburg (Modellversuch):

Für die Gewinnung des Extraktes H 700 wurden genau die industriellen Schritte eingehalten. Hierzu wurden durch

parallele Arbeitsgänge drei wäßrige Auszüge hergestellt, zum Spissumextrakt weiter verarbeitet und anschließend zusammen- gemischt. Während des Herstellungsganges wurden nach verschie- denen Produktionsschritten wie folgt Proben entnommen und darin die Keimzahlen ermittelt:

- a) Nach Perkolation (Miscella)
- b) " Einengung im Sambah-Verdampfer
- c) " Auflösung des Spissumextraktes
- d) " Filtration der Lösung von c)
- e) " erneuter Einengung im Sambah-Verdampfer
- f) " Mischung der Spissumextrakte.

Die Probenentnahmen erfolgten mittels steriler Gefäße (wie unter 2.2. angegeben).

Erster Produktionsschritt:

1,25 kg grobgeschnittene Fo-
lia Farfarae und 1,00 kg Li-
chen Islandicus wurden zusam-
men gemischt, in 2 große Per-
kolatoren gegeben, die mit
kaltem Wasser gefüllt wurden.
Nach 25 Std. wurde die Mis-
cella in einem Gefäß gesam-
melt. Die Verdampfung erfolgte
in einem Sambah-Glasver-
dampfer der Firma Quickfit,
Wiesbaden (siehe Abb. 11).
Zweck Beseitigung der Schweb-
stoffe wurde der gewonnene
Spissumextrakt mit zweifacher
Menge Wasser verdünnt und
filtriert. Nach Filtration
wurde noch einmal mit Hilfe

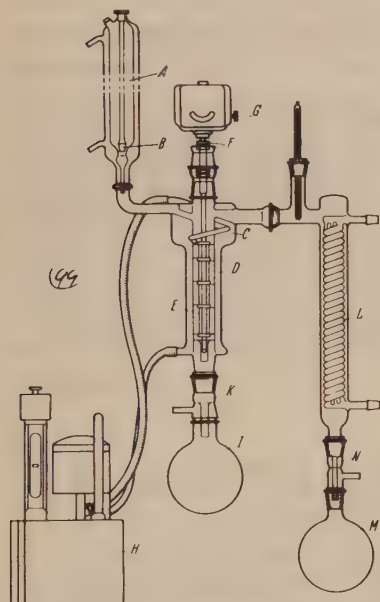


Abb. 11. Sambah-Glasver-
dampfer
(Fa. Quickfit, Wiesbaden)

des Sambah-Verdampfers eingedickt.

Zweiter Produktionsschritt: 0,2 kg grobgeschnittene Rad. Pri-
mulae wurde ebenfalls in einen Perkulator gegeben, der mit

heißem Wasser (ca. 70°C) gefüllt wurde. Nach etwa einer Stunde wurde die Miscella in einem Behälter gesammelt und wie bei Produktionsschritt 1 bis zum Spissumextrakt weiterverarbeitet.

Dritter Produktionsschritt: Hierzu wurde 1,0 kg grobgeschnittene Radix Altheae in einen Perkolator gegeben und als Extraktionsmittel kaltes Wasser verwendet. Nach 24 Std. wurde die Miscella in einem Behälter gesammelt und durch Sambay-Verdampfer (nur einmal) zum Spissumextrakt weiterverarbeitet. Anschließend wurden die Spissumextrakte aus den Ansätzen 1, 2 und 3 miteinander vermischt.

2.4. UV-Bestrahlung der Spissum-Extrakte H 700 und H 740 zwecks Keimzahlreduzierung

Auf eine Glasplatte von 30 cm Länge und 10 cm Breite wurden in getrennten Versuchen jeweils 10 g Spissumextrakt H 700 und H 740 dünn aufgetragen und mit Hilfe einer Camag Universal UV-Lampe (Wellenlänge = 350 nm) aus einem Abstand von etwa 25 cm 5 Minuten lang bestrahlt. Nach jeweils einer Minute wurde von den bestrahlten Extrakten eine kleine Probe entnommen und zur Keimzahlbestimmung (Aufgußplatten-Verfahren) verwendet.

2.5. Sterilfiltration der Miscellen von Extrakt H 700 und H 740 mittels Membranfilter

Hierzu verwendeten wir Sartorius Membranfilter (Typ SM 11307, Porengröße 0,2 µm und SM 11304, Porengröße 0,8 µm) mit einem Durchmesser von 142 mm, die in Membranfilterhalter aus V₂A-Stahl mit Magnetventil eingesetzt wurden. Als Filtrationsgut wurden jeweils 2 Liter Miscella von Extrakt H 700 bzw. H 740 verwendet. Diese dünnflüssigen Auszüge gaben wir in einen Druckkessel mit Ein- und Auslaufventil. Hierauf versuchten wir die Keimfiltrationen unter 2-3 atü Luftdruck durchzuführen. Sowohl bei Extrakt H 700 als auch bei Extrakt

H 740 waren die Filter nach wenigen Sekunden verstopft, so daß eine Sterilfiltration nicht durchgeführt werden konnte. Auch eine vorgeschaltete Klärfiltration mittels Glasfaserfilter brachte keine nennenswert längeren Standzeiten.

2.6. Entkeimungsversucht mittels Seitz EKS-Filter

Mit Hilfe einer Filterpresse aus nicht rostendem Stahl (Typ Pilot PFS I 20Z) mit einer Filtrationsfläche von $0,032 \text{ m}^2$ pro Schicht wurden unter Verwendung von EKS-Filter-Schichten (Seitz-Werke, Kreuznach) direkt an der Produktionsstätte 1 die Miscellen des Extrakts H 700 nacheinander filtriert. Zuvor wurde das Gerät mit eingesetzten Filtern durch Wasserdampf 30 Minuten lang vorsterilisiert. Je 50 Liter der frisch bereiteten Miscellen aus den verschiedenen Produktionsschritten wurden sodann bei etwa 2 atü durch das Filtergerät gepreßt. Anschließend wurde das blanke Filtrat sofort zum Sambay-Verdampfer befördert, welcher ebenfalls vorher 30 Minuten lang durch Wasserdampf keimarm gemacht worden war. Der hiervon auslaufende Spissumextrakt wurde in einem vorher mit Dampf keimarmgemachter Behälter gesammelt und davon unter aseptischen Bedingungen eine Probe zur Keimzahlbestimmung entnommen.

2.7. Bestimmung der Abhängigkeit der Durchflußrate bei Membranfiltern von der Viskosität des Filtrationsgutes

Es wurde die Durchflußmenge durch ein Sartorius-Membranfilter Typ SM 11306, Porengröße $0,45 \mu\text{m}$ von 142 mm Durchmesser in der Zeit von 60 sec bei 1 atü Überdruck und 20°C bestimmt.

Als idealviskose Modell-Lösungen wurden verschiedenen konzentrierte Glucoselösungen verwendet, deren Viskositäten direkt abhängig von den Konzentrationen sind. In Abb. 10 (Seite 48) ist die Durchflußmenge in Abhängigkeit von der Viskosität dargestellt.

Zusätzlich wurden die Versuche mit Polyäthylenglykol 600 durchgeführt, wobei aber zu beachten ist, daß höher konzentrierte Lösungen bei längerer Einwirkzeit die Filter angreifen. Die Viskositätsbestimmungen wurden mit einem Oswald-Viskosimeter ebenfalls bei 20 ° C durchgeführt.

X. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) KALLINGS, L.O.,
RINGERTZ, O., SILVER-
STOLPE, L. und
F.ERNERFELDT

Acta Pharmac. Suecica 3, 219
(1966)

KALLINGS, L.O.,
ERNERFELDT, F. und
L.SILVERSTOLPE

Acta path. microbiol. Scand.
66, 287 (1966)
- 2) MOSSEL, D.A.A. und
P.H.LIST

Pharmazie in unserer Zeit 4, 97
(1973)
- 3) USP XVIII

Official from September 1970.
Mack Printing Company, Easton
- 4) WALLHÄUSSER, K.H.

Pharm. Ind. 8, 549 (1972)
- 5) SPEISER, P. und
S.WANANDI

Pharm. Acta Helv. 45, 501 (1970)
- 6) BÜHLMANN, X., GAY, M.,
HESS, H. und F.KNÜSEL

Pharm. Acta Helv. 43, 374 (1968)

KRÜGER, D.

Pharm. Ind. 35, 569 (1973)
- 7) DIDING, N.,
WERGEMANN, L. und
G.SAMUELSON

Acta Pharmac. Suecica 5, 177.
183. 199. 205 (1968)
- 8) BERGEY's Manual of
Determinative Bacterio-
logy

7.Edition (Williams and Wilkins,
Baltimor 1957)
- 9) TOPLY, W.W.C. and
G.C.WILSON,
"Principles of Bac-
teriology and Immunity"

4.Edition (Williams and Wilkins,
Baltimor 1957)
- 10) COWAN, S.T. and
K.J.STEEL, "Manual
of the Identification
of Medical Bacteria"

Cambridge University Press
(1965)
- 11) SMITH, N.R., GORDON, R.E.
and F.E.CLARK,
"Aerobic Sporenforming
Bacteria"

U.S.Dep. Agric. Agriculture
Monograph no.16 (1952)

- 12) EMBERGER, O., "A Contribution to Cultivation Methods for The Detection of Aerobic Sporeforming Bacteria" Zbl. Bakt. Abt. II 125, 555 (1970)
- 13) WALLHÄUSSER, K.H. und H. SCHMIDT, "Sterilisation - Desinfektion - Konservierung - Chemotherapie" G. Thieme-Verlag, Stuttgart (1967)
- 14) SCHILCHER, H. Planta Medica 2, 100 (1970)
- 15) LIST, P.H. und K. TERLINDEN Pharm. Ind. 30, 219 (1968)
- 16) FRÄNKEL-CONRAT J. biol. Chem. 154, 227 (1944)
- 17) KIELHÖFER, E. Weinberg und Keller 7, 235 (1962)
- 18) Pharmac. Sciences, ref. Pharm. in unserer Zeit 174, 1248 (1971)
1, 130 (1972)
- 19) ULLMANNs Encyclopädie der technischen Chemie Bd. 12, 491 (1960)
Darmstadt (1962)
RÖSSLER, W. Milchwirtschaft 35, 1467 (1972)
- 20) ASCHE, H., BÜCHI, J. und K. STEIGER-TRIPPI Pharm. Acta Helv. 37, 205. 610. 711 (1962)
- 21) WILKE, H. Dtsch. Apoth. Ztg. 93, 214 (1953)

LEBENS LAUF

Am 12. Juni 1937 wurde ich als Sohn des Beamten Abbas Nikbacht und seiner Ehefrau Tallat geborene Sawarehi in Isfahan/Persien geboren. Ab 1944 besuchte ich die Grundschule und anschließend die Mittelschule in Isfahan. Im Herbst 1950 trat ich in die Harati-Oberschule in Isfahan ein, wo ich im Sommer 1957 das Abitur bestand.

Nach einem einjährigen Deutschlehrgang begann ich im Wintersemester 1959/60 mit dem Chemie-Studium an der T.H. Karlsruhe. Bedingt durch eine Finanzkrise in meinem Heimatland wurden 1962 alle Stipendien gestrichen, so daß ich gezwungen war, ab März 1962 als Chemielaborant in Frankfurt zu arbeiten. Da nach 2 Jahren immer noch keine Besserung eingetreten war, bin ich im Januar 1964 nach Persien zurückgekehrt, wo ich zwischenzeitlich als Lehrer tätig war. Schließlich konnte ich ein Stipendium für ein Pharmazie-Studium in Deutschland erhalten und begann dann im SS 1966 erneut an der T.H. Karlsruhe. Im Juni 1969 legte ich das Pharmazeutische Staatsexamen ab und arbeitete anschließend bis März 1971 in der Rathaus-Apotheke in Urach/Württ. Im Mai 1971 begann ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. P.H. List am Pharmazeutisch-Technologischen Institut der Universität Marburg mit der vorliegenden Promotionsarbeit. Seit 1. Oktober 1971 bin ich als wissenschaftliche Hilfskraft an oben genanntem Institut tätig.

